

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA STROJNÍ
KATEDRA MATERIÁLU



Biokompatibilita uhlíkových vrstev
Biocompatibility of carbon layers

Ing. Irena Šubrtová

FAKULTA STROJNÍ

STUDIJNÍ OBOR: 2303V002

STROJÍRENSKÁ TECHNOLOGIE

ZAMĚŘENÍ : MATERIÁLOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Biokompatibilita uhlíkových vrstev **Biocompatibility of carbon layers**

ŠKOLITEL: Prof. Ing. Petr Louda, CSc.

Rozsah práce
Počet stran : 118
Počet obrázků : 55
Počet tabulek : 14
Počet příloh : 0

V Liberci, červen 2006

Poděkování

Dovoluji si touto cestou poděkovat svému školiteli Prof. Ing. Petru Loudovi, CSc. za odbornou pomoc, cenné rady, připomínky a vedení během celého doktorandského studia. Současně chci poděkovat celému kolektivu katedry materiálu. Kolegům Ing. Jiřímu Cermanovi a Ing. Alešovi Kolouchovi, Ph.D. z výzkumného centra NANOPIN MŠMT 1M0577 za pomoc při analýzách na optickém profilometru a při stanovení povrchové energie vrstev. Srdečně děkuji Ing. Janu Grégrovi za konzultace a pomoc. Dále děkuji Dr. Katarzyně Miturové za odborné vedení během experimentů v Centru of Excellence NANODIAM v Lodži. Děkuji MUDr. Lucii Bačákové, CSc. a Mgr. Lubici Grausové za umožnění provedení testů s osteoblasty. Děkuji Ing. Olze Bláhové, Ph.D. a RNDr. Vilmě Buršíkové, Ph.D. za nanoindentační testy.

Speciální poděkování patří Tomáši Tobě.

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Disertační práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím disertační práce a konzultantem.

Datum

Podpis

Anotace

V první části práce se zaměřujeme na čtyři uhlíkové vrstvy deponované na vzorky z oceli AISI 316L při různých procesních parametrech metodou MW/RF PACVD (Microwave and Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition). Studovali jsme jejich vlastnosti v závislosti na procesních parametrech depozice. Na vytvořených uhlíkových vrstvách byla sledována in vitro adheze a proliferace osteoblastů MG 63, s použitím čtyř kapalin byly měřeny kontaktní úhly a spočítány povrchové energie vrstev, byly provedeny nanoindentační analýzy indentorem Vickers a Berkovich, byla monitorována mikrostruktura a topografie vrstev optickou mikroskopií, elektronovou mikroskopií a optickým profilometrem. V druhé části práce se zabýváme sledováním dvou typů Diamond Powder Particles (DPP) vytvořených při dvou procesech metodou MW/RF PACVD. Byla provedena analýza DPP elektronovým mikroskopem a byly připraveny masti s DPP a bílou vazelínou. Dále byla provedena in vivo studie patch testy, kde byly sledovány protizánětlivé účinky DPP v porovnání s účinky běžně užívaných léků.

Klíčová slova: biokompatibilita, uhlíkové vrstvy, Diamond Powder Particles (DPP), smáčivost, tvrdost, adheze a proliferace osteoblastů, patch testy

Annotation

In the first part of this work, we investigated four carbon layers deposited by different process parameters by method MW/RF PACVD (Microwave and Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition) on samples from stainless steel AISI 316L. We studied properties of carbon coatings in dependence on their process parameters. On created carbon layers were observed in vitro growth and adhesion of osteoblast cells MG 63, measured contact angles with four liquids and calculated surface energies, made nanoindentation tests by Vickers and Berkovich indenter, monitored topography of surface with optical microscopy, scanning electron microscopy and optical profilometer. In the second part of this work, we observed two Diamond Powder Particles (DPP) made by MW/RF PACVD system by two different process parameters. DPP were observed by scanning electron microscopy and were prepared creams with DPP and vaselinum album. We have study anti-inflammatory effects of these powders in vivo by patch tests in comparison with effects of commonly using drugs.

Keywords: biocompatibility, carbon layers, Diamond Powder Particles (DPP), wettability, hardness, osteoblast adhesion and proliferation, patch tests

Použité zkratky

| | |
|-------------|---|
| AAHP | 2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride |
| CVD | Chemical Vapour Deposition |
| CSM | Continuous Stiffness Measurement |
| DC | Direct Current |
| DPP | Diamond Powder Particles |
| DLC | Diamond Like Carbon |
| DSI | Depth Sensing Indentation |
| ECR | Electron Cyclotron Resonance |
| HA | Hydroxyapatit |
| HF | Hot Filament |
| HPHT | High Pressure High Temperature |
| IgE | Imunoglobulin E |
| IS | Imunitní systém |
| MDBGN | Methyldibromoglutaronitrile |
| MW | Microwave |
| MW CVD | Microwave CVD |
| MW/RF PACVD | Microwave and Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition |
| NCD | Nanocrystalline Diamond |
| PA CVD | Plasma Assisted CVD |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PVD | Physical Vapour Deposition |
| PLD | Pulsed Laser Deposition |
| RF | Radio Frequency |
| RF CVD | Radio Frequency Chemical Vapour Deposition |
| RGD | Arg-Gly-Asp |
| SEM | Scanning Electron Microscopy |
| S.E.M. | Standard Error of the Mean |

Obsah:

| | |
|---|-----------|
| 1. Úvod | 9 |
| 2. Cíl práce | 10 |
| 3. Teze práce | 10 |
| 4. Teoretická část | 11 |
| 4.1 Povrchové úpravy kovových implantátů | 11 |
| 4.1.1 Historie implantátů | 11 |
| 4.1.2 Definice | 11 |
| 4.1.3 Metody fyzikálně-chemické | 13 |
| 4.1.4 Metody biochemické | 19 |
| 4.3 Uhlík a jeho formy | 21 |
| 4.4 Diamant a depozice vrstev | 25 |
| 4.4.1 Depoziční systémy | 27 |
| 4.4.1.1 DC výboj | 28 |
| 4.4.1.2 RF – Kapacitní výboj | 28 |
| 4.4.1.3 Mikrovlnný výboj | 30 |
| 4.4.2 Diamond Like Carbon (DLC) | 31 |
| 4.4.3 Nanocrystalline diamond (NCD) | 34 |
| 4.4.3.1 Mechanizmy nukleace diamantu | 35 |
| 4.4.4 Diamond powder particles (DPP) | 37 |
| 4.5 Povrchová energie | 38 |
| 4.5.1 Způsoby měření povrchového napětí pevných látek | 41 |
| 4.5.1.1 Měřicí tinktury | 41 |
| 4.5.1.2 Kapková metoda | 42 |
| 4.6 Alergická reakce a typy alergií | 44 |
| 4.6.1 Struktura kůže | 46 |
| 4.6.2 Kontaktní alergická dermatitida | 47 |
| 4.6.3 Alergeny a navození senzibilizace | 48 |

| | |
|---|------------|
| 5. Experiment I | 49 |
| 5.1 Materiály a depozice | 50 |
| 5.2 Měření kontaktního úhlu a stanovení povrchové energie | 52 |
| 5.2.1 Princip a zařízení | 52 |
| 5.2.2 Měření kontaktního úhlu | 54 |
| 5.2.3 Stanovení povrchové energie dle vztahů Andrewse | 55 |
| 5.2.5 Povrchové napětí stanovené pomocí tinktur | 57 |
| 5.3 Mikrostruktura a topografie vrstev | 62 |
| 5.3.1 Optická mikroskopie | 62 |
| 5.3.2 SEM analýza | 62 |
| 5.3.3 Analýza vrstev optickým profilometrem | 67 |
| 5.3.4 Kontaktní profilometr | 73 |
| 5.4 Nanoindentační testy | 74 |
| 5.4.1 Berkovich | 74 |
| 5.4.2 Vickers | 77 |
| 5.5 Scratch test | 80 |
| 5.6 Adheze a proliferace osteoblastů | 83 |
| 6. Experiment II | 87 |
| 6.1 Příprava Diamond Powder Particles | 88 |
| 6.2 SEM analýza prášků | 88 |
| 6.3 Příprava masti s DPP | 91 |
| 6.4 Patch testy | 91 |
| 6.4.1 Mast s DPP versus Elocom | 94 |
| 6.4.2 Mast s DPP versus Mupirox | 100 |
| 6.4.3 Mast s DPP versus Mykoseptin | 103 |
| 7. Diskuse výsledků | 104 |
| 8. Závěry | 106 |
| 9. Publikace doktoranda | 107 |
| 10. Literatura | 109 |

1. Úvod

Medicínské implantáty by měly vyhovovat několika základním podmínkám pro bezpečné užití. Implantát by neměl obsahovat toxické ani alergenní složky a měl by být bez mutagenních a karcinogenních efektů. V závislosti na použití musí vykazovat hemokompatibilitu, thromboresistivitu nebo také biofunkcionalitu. Každý implantát je vystaven zvětšující se degradaci díky kontaktu s tělními tekutinami. Koroze je důležitý fenomén v případě kovových implantátů a může vést k úbytku kovu a tedy i ke ztrátě mechanických vlastností implantátu. Nejvíce používané kovové implantáty jsou: titan a jeho slitiny, Co-Cr-Mo slitiny a medicínská ocel AISI 316L. Materiály těchto skupin nabízejí náležité mechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti, ale jejich tolerance k tělu je různorodá. Zlepšení biokompatibility a tolerance kovových materiálů může být dosaženo modifikací povrchu implantátů.

Metody PVD (Physical Vapour Deposition) a CVD (Chemical Vapour Deposition) jsou používány hlavně pro produkci tvrdých, abrasivně a korozně odolných vrstev karbidů, nitridů a kovových oxidů na slitinách kovů. Díky metodám RF CVD (Radio Frequency CVD) vznikla možnost vytvářet diamantové vrstvy (DLC - Diamond Like Carbon) a vrstvy nanokrystalického diamantu (NCD – Nanocrystalline Diamond), které jsou charakteristické vysokou biotolerantností. Nanokrystalické vrstvy vykazují velmi dobré antialergenní bariérové vlastnosti. Uhlíková vrstva vytvořená v RF CVD metodou dekompozicí uhlovodíků má tloušťku od několika do desítek nanometrů a je amorfni nebo nanokrystalická. Vrstva se plynule transformuje do přechodové difúzní vrstvy kovových karbidů a potom do základního kovu. Vlastnosti uhlíkových vrstev silně závisí na poměrném množství mezi vazbami sp^2 (uhlíkový typ vazby) a sp^3 (diamantový typ tetragonální vazby).

2. Cíle práce

Hlavními úkoly práce je provést hodnocení vlastností uhlíkových vrstev a prášků deponovaných duální metodou MW/RF PCVD při různých podmínkách depozice a najít možné vlivy depozičních parametrů na vlastnosti vytvořených vrstev a prášků. Vzhledem k cíli užití uhlíkových vrstev v kostní chirurgii, je nutné sledovat nejen jejich mechanické a fyzikální vlastnosti, ale také především experimentálně ověřit jejich biokompatibilitu a sledovat další interakce s lidskými buňkami.

3. Teze práce

Duální frekvenční systém MW/RF PACVD v Centru Nanodiam v Lodži byl postaven s cílem depozice uhlíkových vrstev pro biologické aplikace. Myšlenkou práce je zaměřit se nejen na hodnocení fyzikálních a mechanických vlastností vrstev klasickými metodami (kontaktní úhel, povrchová energie, nanoindentace, scratch, mikrostruktura, topografie), ale především zjistit, jak se budou chovat vrstvy a prášky vytvořené touto metodou v kontaktu s lidskými buňkami či lidským tělem. To umožňují metody in vitro sledování růstu a proliferace lidských kostních buněk, což je metoda tradiční a na zpracování náročnější. A pokud předchozí studie ukazují na dobrou biokompatibilitu in vitro, vyzkoušet materiál přímo in vivo, jež se nabízí jako jednodušší a zároveň jako další logický krok. Velmi vhodné se nabízí testování prášků pomocí patch testů, které jsou velmi jednoduchou a navíc přímou metodou.

4. Teoretická část

4.1 Povrchové úpravy kovových implantátů

4.1.1 Historie implantátů

Historie implantátů je stará tisíce let, již Majové v centrální Americe vyplňovali zubní ztráty mušlemi speciálně vybranými pro tento účel. [1] První oficiální publikace zaměřená na aplikace implantátů je datována rokem 1565, kdy Petronius psal o užití zlatých plíšků pro korekce vad patra. V sedmáctém století používal Fabritius dráty vyrobené ze železa, mědi a bronzu k léčení zlomenin.[2] V roce 1804 použil Bell zlaté a stříbrné jehly a také hliníkové nebo mosazné destičky. [1]

Ve dvacátém století přišly na řadu nové materiály. V USA roku 1920 byla pro potřeby medicíny vyrobena kobalt-chrom-molybdenová slitina nazvaná Vitallium. Vitallium o složení 60%Co, 20%Cr, 5% je využívána pro chirurgické nástroje, protézy, implantáty a dentální aplikace.

Během 2. světové války byl v centru zájmu titan a jeho slitiny, byly ovšem realizovány až po roce 1940. V letech 1972-74 byla vyrobena medicínská ocel AISI 316L a její složení bylo v téže letech patentováno. [2] [57]

4.1.2 Definice

Běžně užívaná definice biomateriálů zní takto: „jedná se o přírodní nebo uměle vyrobený materiál, který je použit (umístěn) celý nebo částečně v živé struktuře nebo plní biomedicínskou úlohu, podporuje či nahrazuje přirozené funkce“. [3].

Norma Evropské unie definuje implantát jako: medicínské zařízení v kontaktu s tkání / kostí (včetně tělních tekutin) (....) a krví. [4]

Lékařské výrobky (produkty) jsou definovány jako: „jakýkoli materiál, nástroj, aparát, zařízení nebo další předměty (...)určené výhradně nebo zásadně pro diagnostické účely (...) léčbu (...) nemocí (...) nebo zranění (...) a náhrady či modifikace anatomických nebo fyziologických procesů“. [4]

S ohledem na to, že implantáty setrvávají v kontaktu s různými typy tkání a tělních tekutin, musejí splňovat mnoho přísných podmínek. Jednou z klíčových vlastností je jejich biokompatibilita, definovaná jako schopnost daného materiálu patřičné funkčnosti a absence negativních vlivů na organismus příjemce. [5] Neméně podstatnou vlastností je bio-

funkcionalita, spočívající v plnění vyžadovaných funkcí in vivo během předpokládané doby, a v neposlední řadě korozní odolnost, otěruvzdornost a homogenita.

Doposud nebylo možné vytvořit takový materiál, který by kompletně splňoval všechny výše zmíněné podmínky a funkčnosti. Typická nepříjemná reakce organismu pro ne-náležitě vybraný biomateriál je obklopení implantátu fibrózní tkání a vytvoření typu „kapsulí“ s cílem odloučení daného biomateriálu od kontaktu s tkání organismu. [6] Pro efektivní použití ortopedických a dentálních implantátů je nutné získat dobrou shodu pro spojení mezi povrchem materiálu a kostním prostředím. [7] Všechny biomateriály podléhají degradaci, což znamená, že se materiál transformuje na méně komplexní přechodové či konečné produkty. Je důležité zaručit, aby degradace těchto produktů nezpůsobila negativní vlivy jako jsou toxické, mutagenní, karcinogenní a zánětlivé efekty a aby byla možnost rychlého odstranění implantátu z organismu. [8] Kovové implantáty podléhají korozi, která může být způsobena také napětím existujícím v materiálu kovu nebo formovaným pod vlivem externích sil. Korozní produkty mohou vytvářet vrstvy adheující ke kovovému povrchu. Taková vrstva může chránit kov před dalším porušením. [9]

Obecně akceptovaným kovem pro výrobu implantátů je titan a jeho slitiny. Titan je vysoce korozně odolný díky tenké a stabilní vrstvě oxidů. Ačkoli tato vrstva může být porušena a následkem toho může dojít k velkému uvolnění iontů, mohou tyto ionty difundovat do okolní tkáně a být dále transportovány krví až do tkáně velmi vzdálené. [10] [57]

Biokompatibilita implantátů závisí na fyzikální struktuře materiálu a jeho fyzikálních a mechanických vlastnostech v oblasti interakce s biologickým systémem. [11]

Za účelem zlepšení biokompatibility, korozní odolnosti a otěruvzdornosti při zachování výhod biomateriálových vlastností, se provádějí určité změny v oblasti povrchové vrstvy implantátů.

Modifikovaný povrch implantátu by měl být:

- homogenní
- s vhodnou adhezí, která má zajistit odolnost proti delaminaci
- trvalý a funkční
- tenký tak, aby zajistil neměnnost geometrie a mechanických parametrů implantátu
- odolný vůči sterilizačním procesům. [57]

Všechny typy modifikací povrchu kovových implantátů mohou být rozděleny do následujících skupin:

- fyzikálně-chemické - modifikace dovolující změnit chemické složení existujícího povrchu a tak měnit i jeho fyzikální vlastnosti (mikrostrukturu, povrchovou topografii, korozní odolnost a oteruvzdornost)
- biochemické - tyto modifikace jsou založeny na tvorbě nebo přidání organických složek, které zajistí navázání biologicky aktivních makromolekul na povrch. [57]

4.1.3 Metody fyzikálně-chemické

Modifikace povrchu kovových implantátů může být vykonaná různými metodami, a každá z nich umožňuje získat jiné vlastnosti povrchu. Pro ortopedické a dentální aplikace je povrch modifikován za účelem získání odpovídajícího stupně pórovitosti. Kostní tkáň přirůstající k drsnému povrchu zajišťuje pevné spojení mezi implantátem a okolním prostředím. In vivo testy ukázaly, pozitivní vztah mezi drsností povrchu a spojením buněk, aktivací osteoblastů, syntézou kolagenu a růstem chrupavky. [12]

Ačkoli v případě implantátu, který je v kontaktu s krví, musí být drsnost povrchu co nejmenší. Všechny i ty nejmenší póry povrchu implantátu jsou většinou bezprostředně vyplněny krevními buňkami. [13]

Nejjednodušší úpravou povrchu je jeho broušení abrazivním materiálem s různou zrnitostí. To dovoluje získat různý stupeň drsnosti povrchu. Pokud abrazivní materiál povrch znečišťuje, je nutné další opracování.

Elektrolytické leštění je proces anodického narušení kovového materiálu. Přiložené napětí zapříčiní, že základní část elektrického náboje se shromažďuje na vyvýšených bodech profilu povrchu, které působením intenzivně rozrušují a vyrovnávají. [6] Elektrolytické leštění dovoluje získat povrch bez deformací a bez narušení krystalové struktury. Stupeň vyhlazení povrchu je tím větší, čím je struktura i složení kovu homogennější. [2]

Při výrobě implantátů pro dentální a ortopedické implantáty se používá pískování. [14] Korundová zrna používaná při této metodě čistí povrch a zároveň materiál získá vhodnou drsnost, což pomůže integraci buněk na povrchu implantátu. Korundová zrna, která narážejí na kovový povrch, přenášejí kinetickou energii, tato energie je částečně absorbovaná krystaly kovu, což způsobuje lokální natavení a četné defekty krystalové struktury.

Velikosti natavených oblastí a oblastí s defekty závisejí na vlastnostech substrátu a kinetické energii korundových zrn. Čistá korundová zrna jsou také přidávána do vodní suspenze oxidu titaničitého nebo hydroxyapatitu (HA). Připravená směs se suší a následně spéká. Takto připravenými zrny, jejichž jádro je korund, se pískováním modifikuje povrch implantátu. Vrstvy TiO_2 a HA jsou charakteristické dobrou adhezí ke kovovému substrátu a nepodléhají změnám během čištění ultrazvukovými vibracemi nebo při čištění v alkoholových roztocích. Pískování umožňuje získat povrch implantátu se středním stupněm drsnosti v rozmezí $R_a = 10 - 15 \mu\text{m}$.

Na povrch kovu může být nanесena nerozpustná keramicko-silikonová vrstva, čímž se urychluje obnova kostní tkáně. [14] Tato metoda v kombinaci s ostatními technikami povrchové modifikace (jako je leptání v kyselině) umožňuje získat výrazně lepší povrch implantátů pro kostní integraci. Maximální navázání kostní tkáně na povrch je sledována v případě implantátů pískovaných částicemi TiO_2 se zrnitostí v rozmezí $180-220 \mu\text{m}$. [12]

Populárním procesem modifikace povrchu titanu a jeho slitin je hydrotermální povrchová modifikace, namáčením ve vodním roztoku CaO za současného ohřevu. Vysoké hodnoty PH, tlaku a teploty zapříčiní zvýšení tloušťky modifikované vrstvy a zesilují syntézu titaničitanu vápenatého na titanu a jeho slitinách. Na takovémto povrchu dochází ke zvýšení precipitace apatitu. Výhodou je sterilita hydrotermálně upraveného povrchu, která je nutná před implantací. Velká oblast teplot a tlaků při této metodě dovoluе vytvářet různé mikrostruktury na povrchu implantátu. [15]

Jednoduchá chemická metoda, díky které je možno indukovat bioaktivitu titanu a jeho slitinám, je úprava ve vodním roztoku 10M NaOH zakončená ohřevem. Na povrchu titanu nebo jeho slitin (Ti-6Al-4V , Ti-6Al-2Nb-Ta nebo Ti-15Mo-5Zr-3Al) se během procesu vytváří tenká vrstva titaničitanu sodného. Na takto upraveném povrchu se v simulovaném tělním prostředí (SBF - Simulated Body Fluids) vytváří kompaktní a homogenní vrstva apatitu. Modifikovaný povrch s vrstvou apatitu usnadňuje spojení s živou kostní tkání. Během tepelného zpracování je vrstva hydrogelu dehydratována a transformována na stabilní amorfni nebo krystalovou formu. Možnost kontroly modifikace může zabránit heterogenní nukleaci na povrchu. Poskytuje pozitivní prognózu v oblasti výzkumu srdečních chlopní a patologické kalcinózy, kde jsou mineralizační procesy nežádoucí. [16,17]

Také roztoky kyselin mohou být užity pro úpravu povrchu biomateriálů. Ponoření titanu nebo jeho slitin do roztoků kyselin mohou být vytvořeny speciální elektrické, optické nebo biochemické vlastnosti povrchu. [18]

Titanové vzorky modifikované fosfoniovou kyselinou (např. Metylodiphosphonic (MDP) a etylo-1,1,2-triphosphonic (ETP) kyselinou) mají dobrou proliferaci osteoblastů. [19] Bylo zjištěno, že celkové množství proteinů je vyšší u ETP modifikovaného povrchu než u nemodifikované verze. Funkční skupiny těchto kyselin zlepšují buněčnou adhezi, růst kostní tkáně a spojení mezi implantátem a kostí [19,20]. Kovalentní vazby vytvořené mezi molekulami fosfoniové kyseliny a titanovým povrchem mohou vytvořit nové lešení („scaffolds“) pro nově se tvořící kostní tkáň, vedoucí ke spojení implantátu a tkáně. [19]

Tepelným zpracováním se může vytvořit vysoce odolná vrstva na povrchu titanu. Je založena na získání hydroxyapatitového prášku (HA) precipitační reakcí z roztoku $\text{Ca}(\text{NaO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Prášek hydroxyapatitu, zahříváný ve vakuové peci po hydrataci destilovanou vodou, vytváří pastu, která se umísťuje na titanové části. Po tomto procesu jsou části vysušeny a tepelně zpracovány. Metoda umožňuje získat tenkou odolnou drsnou vrstvu HA. Pórozita se zvyšuje společně se zvyšující se zrnitostí a teplotou. [20]

Vrstva fosforečnanu vápenatého vzniká a roste na titanu z vodního roztoku povrchově indukovanou mineralizací (SIM – surface induced mineralisation). Na rozdíl od konvenčních metod je proces precipitace hydroxyapatitových vrstev výhodný díky nízkým procesním teplotám a tvorbě homogenních vrstev na povrchu tvarově složitých součástí, ale také na mikroporézním povrchu. Díky nízké teplotě je možná kontrola fázových transformací a krystalických procesů, což může být důležité v oblasti problematiky umělých chlopní. Předchozí studie prokázaly, že takto vytvořené vrstvy jsou stabilní a kostní tkáň se tvoří rychleji než je tomu v případě vrstev připravených metodou „plasma spraying“. [21]

Velký zájem je upřen na metodu vyživající laserovou ablaci – pulzní laserovou depozici (PLD – Pulsed Laser Deposition). Silně fokusovaný laserový paprsek dopadá na terč tedy vypařovaný materiál. Absorpce laserového záření umožňuje indukci atomů terče, která vede k ablaci. Reakce mezi laserovým paprskem a vypařovaným kovem ve výsledku zvyšuje energii vypařovaného kovu a rozprašování materiálu targetu a následné nanášení a difúzi do modifikovaného materiálu. PLD metodou lze připravit monovrstvy nebo multivrstvy různých druhů (oxidů, nitridů, karbidů, boridů a dalších; případně jejich směsí). Připravené vrstvy jsou charakteristické svou dobrou adhezí, homogenitou a nanokrystalickou strukturou. Je také možné připravit tenké fullerénové vrstvy v uhlíkových povlacích, organické povlaky skládající se z vodivých polymerů, diamantové nebo hydroxyapatitové vrstvy. [22]

Vlastnosti laserového záření dovolují vytvářet a modelovat rýhy s hloubkou několika mikrometrů. Hallgren se spolupracovníky [23] modifikoval pomocí neodymiového laserového paprsku s parametry 532nm a 10Hz povrch nosné závitové části titanového šroubu. Laserový

paprsek vedený přes křemennou destičku je odchylován a následně fokusován na povrch závitů ve formě 290 světelných bodů. Světelné body pronikají do materiálu do hloubky 30 μm a tvoří kráterky o průměru 10 μm . Jamky umožňují penetraci kostní tkáně a tvorbu kostních buněk. Teplo je během procesu ablace transportováno skrz titan oxidovou vrstvu, což vede, v důsledku velkých napětí formovaných v okolí kráterů, k mikrotrhlinám v jejich okolí. Tato metoda je používána pro mikromodelaci závitů dentálních a ortopedických implantátů. [57]

Anorganické vrstvy, jako jsou skleněné a keramické vrstvy, lze na implantátech nanášet metodou Sol-Gel. Rozšířené jsou jak jednosložkové tak i vícekomponentní vrstvy. Tato technologie umožňuje kontrolovat drsnost vrstev a přítomnost hydroxylových skupin. Za účelem vylepšení vlastností HA vrstev nanášených na kovové biomateriály se jako první nanese vrstva křemičitanu a na ní pak fosforečnan vápenatý. [6] Studie provedená Michalíkem a spolpr. [25] prezentuje vyšší adhezi HA vrstev k substrátu než byla u sledovaných diamantových vrstev. Vrstvy nanášené metodou Sol-Gel mají difúzní charakter. Dalším důležitým faktem je možnost vytvoření baktericidních vrstev obsahujících ionty stříbra, mědi a zinku. [6] Získané vrstvy jsou korozně a abrazně odolné. [24]

Nanášení vrstev na implantáty může být prováděno i elektroforézou. [26] Díky elektrickému odporu nabitých částic nedochází ke koagulaci a aglomeraci. Metody elektroforézy jsou používány v případě hydroxyapatitových vrstev vytvářených z různých typů vodních roztoků, nicméně takto nanášené vrstvy jsou charakteristické omezenou adhezí k substrátu. Zvýšení adheze může pomoci nanášení vrstvy na předtím vytvořené křemičitanové vrstvě. Výhoda této metody je úzká oblast teplot a možnost zakotvení homogenní vrstvy na profilovaném povrchu. [6]

CVD (Chemical Vapour Deposition) a PVD (Physical Vapour Deposition) metody umožňují nanášet vrstvy z plynné fáze buď fyzikálně nebo chemicky a hrají důležitou roli v modifikaci povrchů. [24] Vzhledem k nemnoha unifikovaným názvům pro mnoho metod PVD, nazývají různí autoři tyto metody různými způsoby. [33] Pomineme-li pestrý výběr metod, pouze některé našly uplatnění v procesech modifikace povrchu implantátů. Jsou používány především k tvorbě tvrdých, otěruvzdorných a korozně odolných vrstev karbidů, nitridů a oxidů kovů na kovových slitinách. Díky metodě RF PCVD (Radio Frequency CVD) je možno vytvářet diamantu podobné vrstvy (DLC - Diamond Like Carbon) a vrstvy nanokrystalického diamantu (NCD – Nanocrystalline Diamond), které jsou charakteristické vysokou biotolerancí. [27,28]

Uhlíkové vrstvy vytvářené metodou RF CVD rozkladem uhlovodíků, mají tloušťku od několika desítek nanometrů a jsou amorfní nebo nanokrystalické. Uhlíkové vrstvy se plynule

transformují do difúzní vrstvy karbidů kovů a následně do základního materiálu. Struktura zabezpečuje vysokou pevnost, velmi dobrou adhezi a také vysokou korozní odolnost. [29] Někdy se pro vylepšení adheze uhlíkové vrstvy k substrátu používá jako kotevní amorfni silikonová vrstva. [30] Vrstvy mohou být aplikované na stomatologické i ortopedické implantáty a chirurgické nástroje. Vrstva amorfniho a krystalického uhlíku může být také vytvářena metodou MW CVD (Micro Wave CVD) a metodou HF CVD (Hot Filament CVD). [2] Metodou PA CVD (Plasma Assisted CVD) je možnost například deponovat vrstvy TiO_2 na oceli AISI 316L, což zlepši korozní odolnost. [31]

Metody Plasma Spraying (plazmový nástřik) jsou další metody povrchových úprav, plazma je vytvořeno v hořáku vlivem elektrického oblouku vyvolaného mezi centrální wolframovou elektrodou a anodou - měděnou tryskou chlazenou vodou. Povlakovaný materiál je přiváděn plynem ve formě prášku přímo do hořáku, kde se transformuje na plazmu (o teplotě cca 10^4 °C). Touto technologií lze připravit HA vrstvy s nano- a poly-krystalickou strukturou. [32] Kromě toho lze také nanášet vrstvy z Al_2O_3 , ZrO_2 a čistého titanu. [6] Na adhezi vrstvy mají vliv kohezni síly a také jev „molecules jamming“.

Vezmeme-li v úvahu popsane skutečnosti, je velice důležité před plazmovým nástřikem adekvátně připravit povrch (očistěním od oxidů a tuků). Adhezi vrstvy je možné vylepšit zvýšením drsnosti povrchu substrátu.[33]

„Glowing methods“ patří mezi plazmové metody, využívají doutnavé výboje vznikající ve směsi plynů za tlaků 10^{-3} – 13hPa. Použitý plyn je ionizován s velkou koncentrací nabitých částic získaných z přiváděného plynu. Důsledkem stálé absorpce energie z elektrického pole, má užitá plazma nízkoteplotní, ne-vyváženou a ne-izotermickou charakteristiku. Pro vytvoření vrstvy je použit abnormální výboj (kdy se zúčastní celý povrch katody). Doutnavý výboj je zdroj tepelné energie, která pomáhá a urychluje chemické a fyzikální procesy, jež probíhají na hranici fází: implantát - reaktivní plyn. Jako katoda je v peci vsázka a anoda je chlazená stěna pece. V oblasti katodového potenciálového spádu dochází k disociaci a ionizaci plynu. Pozitivně nabitá ionty dusíku mířící ke katodě, jsou rapidně urychlovány v oblasti katody, do které pak narážejí. Díky vysoké kinetické energii dochází k zahřívání substrátu a částečnému odprašování jeho povrchu. Katoda, částečně zahřívána tepelným zářením, absorbuje atomy plynu, které difundují do katody a které vytvářejí chemické sloučeniny se složkami substrátu. [33]

Nitridace a oxidace v doutnavém výboji umožňuje vytvářet vrstvy $\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti(N)}$ a TiO_2 na titanových slitinách OT-4-0 (0,4-1,4%Al; 0,5-1,3%Mn; 0,3%Fe; 0,12%Si; Ti – zbytky). Tloušťka těchto vrstev je 35-40 μm a 60 μm .

Výzkumy Czarnowské a kolektivu ukazují, že vrstvy jsou charakteristické velkou biokompatibilitou ve vztahu k lidským fibroblastům (buňkám pojivové tkáně). [34] Použitím uhlovdíků v „glowing“ technice umožňuje depozici karbidových vrstev, karbidu titanu a uhlíkových vrstev. [33,35]

Wierchoń a kolektiv získal v procesu karbonitridace v doutnavém výboji difúzní vrstvu $\text{Ti(CN)-Ti}_2\text{N}-\alpha\text{Ti(N)}$ na titanové slitině Ti-1Al-1Mn . Vrstvy získané nitridací a karbonitridací ve výboji slouží jako bariéra proti metalóze a jsou charakteristické dobrou korozní a abrazní odolností. Následné in vivo experimenty prokázaly vysoký stupeň proliferace buněk a v okolí nezaznamenaly přítomnost složek materiálu implantátu. [36]

„Glowing“ metody jsou používány k čištění, aktivaci a modifikaci povrchu biomateriálů a implantátů. Výhodou těchto metod je možnost kontrolovat technologické parametry procesů, což umožňuje formovat žádanou mikrostrukturu a topografii povrchu. Dále dovoluje kontrolovaně produkovat chemické a fázové složení povrchu. Nitridační procesy ve výbojích dovolují vytvořit vnější vrstvy na tvarově složitých elementech z titanových slitin. [34,35]

Iontová implantace je úprava povrchu zabudováváním jiných atomů do pevného substrátu v důsledku narůstající kinetické energie částic v silném elektrickém poli (od několika keV až po MeV). Iont během první fáze svého pohybu zapříčiní ionizaci a následnou výměnu elektronů mezi iontem a atomy substrátu. Na konci jeho pohybu mají srážky pružný charakter. [33] Energie bombardujících iontů musí být samozřejmě vybrána tak, aby proces implantace převážil nad procesem odprašování. [27] Implantovanými prvky jsou často uhlík, dusík a křemík. [6] Iontová implantace na základě změn provedených ve struktuře krystalové mřížky těsně pod povrchem zvyšuje jeho pevnost a snižuje koeficient tření. [4] Iontová implantace zvyšuje povrchovou korozní odolnost při malé spotřebě a poměrně krátkých procesních časech. [37]

Ze studií Krupy a spol. vyplývá, že se iontovou implantací dusíku zvyšuje korozní rezistence povrchu titanové slitiny OT-4-0. Nejvyšší korozní odolnost byla pozorována pro vrstvy vytvořené dávkami iontů 1×10^{17} na cm^2 . Jsou-li TiN inkluze vznikající během implantace koherentní se strukturou titanové slitiny a rovnoměrně rozloženy po celém povrchu, je korozní odolnost největší. [38] Iontová implantace je používána při výrobě kyčelních endoprotéz, čímž se o desítky procent zvyšuje jejich životnost a oddaluje nutnost výměny. [6] [57]

4.1.4 Metody biochemické

Přidání biologicky aktivních složek je rozšířenou metodou pro vylepšení vlastností biomateriálů, která umožňuje kontrolu buněčné a tkáňové odezvy na kontakt s povrchem implantátu. Dřívější práce se zaměřovaly na polymerní materiály díky přítomnosti funkčních skupin na jejich povrchu, které umožňovaly jednoduché navázání organických složek. Kovy a jejich slitiny tyto vlastnosti postrádají. Nejjednodušší cestou jak modifikovat povrch kovových implantátů je jejich pasivace vytvořením oxidů jednoduchou absorpcí molekul vody, což vede k tvorbě hydroxylových skupin. Je také možné akumulovat proteiny fyzikální adsorpcí, ačkoli tyto vazby jsou relativně slabé. [39] [57]

Silanizace byla po dlouho dobu považována za modelovou metodu pro navázání organických sloučenin k povrchům z TiO_2 , Ti6Al4V nebo Co-Cr-Mo . [40,41] Bohužel tato metoda byla málo produktivní, protože byla limitována malou kvantitou hydroxylových skupin. Použitím fotoelektronové spektroskopie bylo zjištěno, že jen 15% atomů kyslíku na povrchu bylo spojeno s vodíkovými ionty. [42] Velká pozornost byla zaměřena na tvorbu vrstev oxidů a hydroxylových skupin, které vytvářejí organicko-kovové povrchy na titanu. Jejich tvorba se provádí za vysokých teplot za použití kyslíku a vody. Vysoký obsah OH skupin úzce souvisí se stabilizací organických složek na povrchu implantátu. Metoda umožňuje získat maximální množství OH skupin při teplotě 550K. [42]

Peptidy s tripeptidickou sekvencí Arg-Gly-Asp (RGD) jsou důležité v modifikaci povrchu implantátů. Tato sekvence je umístěna v mnoha adhezivních proteinech a složkách extracelulární matrice. [44,45] Čímž podporuje adhezi mnoha typů buněk. Testují se také možnosti ovládání interakcí mezi buňkou a biomateriálem navázáním růstových faktorů na povrch implantátů. Jakkoli RGD peptidy umožňují rychlejší buněčnou adhezi, uvolněné růstové faktory mohou modulovat ostatní buněčné funkce: proliferaci, diferenciaci a aktivitu na povrchu biomateriálu. [46] Schwarz a spolupr. navrhl povrchovou modifikaci slitiny Ti6Al4V , která způsobuje výrazné zvýšení počtu hydroxylových skupin. Bylo zjištěno, že zahříváním tenké vrstvy kyseliny fosforové na povrchu slitiny dává adhezující a trochu drsnou vrstvu $\text{Ti}(\text{H}_3\text{PO}_4)\text{-(TiP)}$. TiP má strukturu vrstvy s velkým množstvím OH skupin ležících v různých úrovních. Další fází modifikace je silanizace s použitím aminopropyl(triethoxy)silanu a navázání proteinů majících RGD sekvence. Takto upravený povrch zvyšuje aktivity kostních buněk. [47]

Další možností je navázání hydroxylových skupin nebo skupin aminů plazmovou polymerizací [56] allylových kyselin nebo allylových aminů na povrchu Ti6Al4V . Dalším

krokem je imobilizace aktivních proteinů, například morfogenního kostního proteinu (Bone Morphogenic Protein: BMP-4), který má vysokou osteoinduktivní aktivitu [44], a je schopný indukovat osteoblastickou odezvu u jiných buněk než tvořících kost.

Nanci a spolupracovníci [49] připravili metodu modifikace titanu umožňující kovalentní navázání molekul. Prvním krokem je upravit titan vytvořením vrstvy TiO_2 ze směsi kyseliny sírové a vodíkového peroxidu. Potom se na vrstvu oxidů nanášejí aminoalkylosilany zprostředkující vazbu vybraných molekul.

Fosfolipidy byly také použity pro úpravu povrchu implantátů. [50] Fosfolipidy jsou důležitým typem biomolekul, jsou to základní stavební jednotky buněčných membrán a jsou to povrchově aktivní látky (surfactant). Povrch titanu byl pokryt komplexem kalcium-fosfolipid-fosfátu (Ca-PL-PO_4). Přes množství fosfolipidů, které bylo zkoumáno, jen v případě fosfolipidu phosphatidyl serine (PS) byl zjištěn nárůst aktivity osteoblastů a navození osteogeneze. [50]

Navázání kolagenů je další metodou spadající mezi úpravy povrchu implantátů. Tato metoda je založená na vytvoření tenké vrstvy propyleny (plazmově), implantaci akrylové kyseliny a poté navázání kolagenu. In vivo testy ukázaly, že takto upravený povrch je biologicky aktivní a není cytotoxický. [51]

Puelo a Mikulec provedly testy schopnosti modifikace povrchu slitin Co-Cr-Mo a Ti6Al4V různými metodami navázání funkčních skupin. Reakce je založena na navázání hydroxylových skupin na povrchu slitin s aktivními složkami. Jen p-NPC (p-nitrophenyl chloroformate) byl efektivní. Odolnost OH-pNPC spojení byla potvrzena odhadem kvantity vazby trypsinu k povrchu. [39,52]

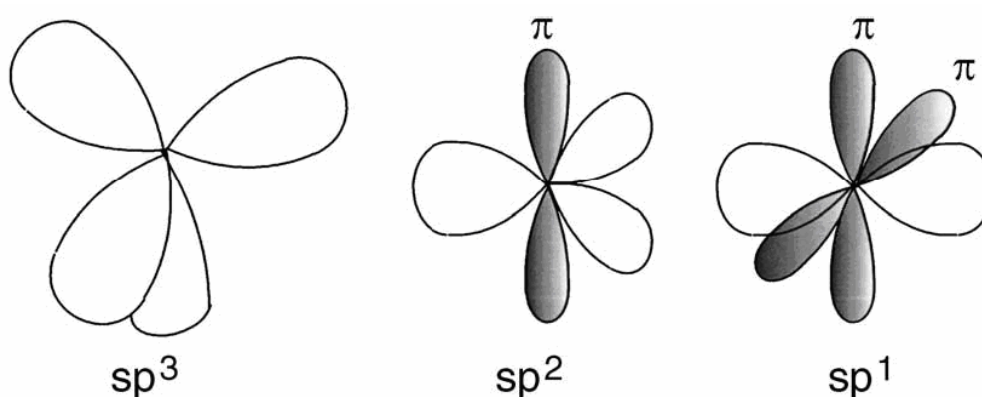
Syntéza funkčních skupin na povrchu implantátu povlakovaného amorfni nebo nanokrystalickou uhlíkovou vrstvou dává zcela nové možnosti. Díky chemickým [53,54,55] nebo plazmovým [4,56] syntézám je možné kontrolované zavedení karboxylových skupin. Taková modifikace velmi výhodně kombinuje vlastnosti uhlíkových vrstev kovových materiálů s požadovanou prezencí daných molekul na povrchu implantátů.

V této kapitole byly popsány běžné úpravy povrchu kovových implantátů. Tyto metody byly rozděleny na fyzikálně-chemické a biochemické techniky, ale metody modifikace mohou být rozděleny z úhlu pohledu očekávaného typu vrstvy povrchu implantátu. Například HA vrstvy mohou být získány sandblasting metodou, NaOH úpravou, termální úpravou, metodou PLD, metodou Sol-Gel, elektroforézním a plazmovým nástřikem. Tvorba uhlíkových vrstev je zase možná metodami PLD, RF CVD, MW PCVD nebo „glowing“ metodami atd.[57]

4.3 Uhlík a jeho formy

| | |
|-----------------------------|---|
| Atomové číslo : | 6 |
| Relativní atomová hmotnost: | 12,0107 amu |
| Hustota: | 2,267 g/cm ³ jako grafit 3,515 g/cm ³ jako diamant |
| Tvrdość: | 0,5 jako grafit a 10 jako diamant - nejtvrdší nerost v Mohsově stupnici tvrdosti |
| Teplota tání: | kolem 3 500 °C tj. 3 773 K |
| Teplota varu: | kolem 4 827 °C tj. 5 100 K |
| Elektronegativita: | 2,55 (Paulingova stupnice) |

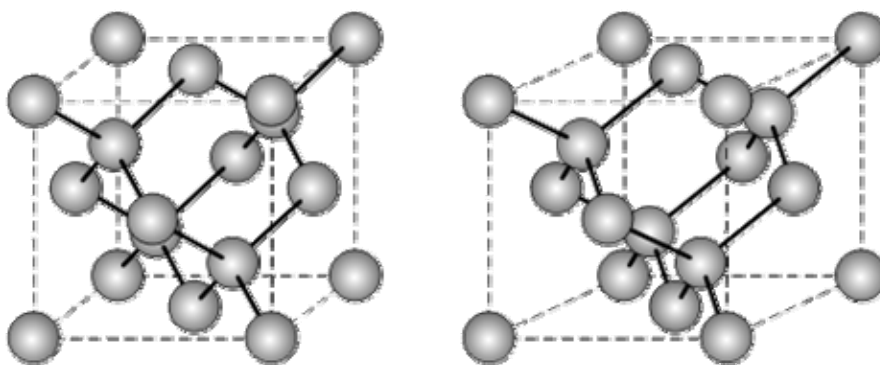
Uhlík, chemická značka **C** (*lat. Carboneum*), je chemický prvek, tvořící základní stavební kámen všech organických sloučenin a tím i všech živých organismů na této planetě. Sloučeniny uhlíku jsou jedním ze základů světové energetiky, kde především fosilní paliva jako zemní plyn a uhlí slouží jako energetický zdroj pro výrobu elektřiny a vytápění, produkty zpracování ropy jsou nezbytné pro pohon spalovacích motorů a tak silniční dopravu. Výrobky chemického průmyslu na bázi uhlíku jsou součástí našeho každodenního života ať jde o plastické hmoty, umělá vlákna, nátěrové hmoty, léčiva a mnoho dalších. [58]



Obr.1. sp^3 , sp^2 a sp hybridizace orbitalů [66]

Tajemství uhlíku je ukryto v jeho valenčních elektronech. Uhlík tvoří velké množství krystalů a neuspořádaných struktur, protože je schopen existovat ve třech hybridizacích sp^3 ,

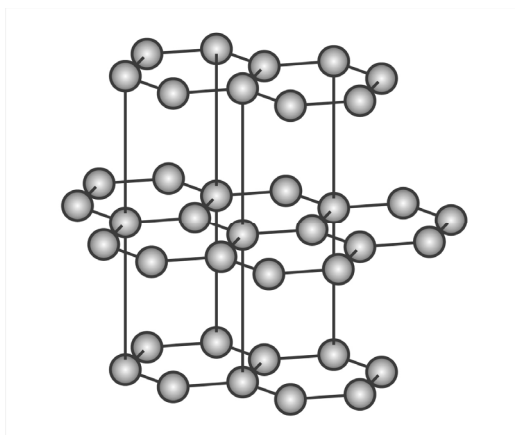
sp^2 a sp^1 **Obr.1.** Z šesti elektronů obklopující jádro uhlíku, dva jsou schopny tvořit chemické vazby. Při dodání určitého množství energie se atom uhlíku dostane do excitovaného stavu a potom čtyři z jeho vnějších elektronů vytvoří typ uhlíkové struktury téhož chemického složení jako čistý uhlík. V mřížce *diamantu* je každý atom spojen se čtyřmi dalšími **Obr.2.** Všechny valenční elektrony se účastní při tvorbě chemických vazeb. Krystal diamantu je příklad valenčního uspořádání, protože každý atom uhlíku umístěný v tetraedru, je spojen s dalším kovalentní vazbou sp^3 . Diamant patří mezi nejtvrďší materiály, kromě toho je velmi dobrým tepelným vodičem, je průhledný s vysokým indexem lomu a značnou optickou disperzí.



Obr.2. Prostorové zobrazení diamantové struktury, nejtěsnějšího uspořádání, každý atom má čtyři vazby na své nejbližší sousedy.

Druhá modifikace *grafit* je opak diamantu. Jednoduše se štěpí a je elektricky vodivý. Grafit je příklad přechodové struktury. Atomy jsou ve vrstvách uspořádány hexagonálně, v rámci každé vrstvy je vazba sp^2 kovalentní (3 nejbližší sousední atomy). Mezi jednotlivými vrstvami je vzdálenost velká a vazba Van der Waalsova typu. Díky této struktuře se grafit chová velmi anizotropicky **Obr.3.** Podél krystalových rovin je tepelně a elektricky velmi vodivý, vedení tepla nebo náboje od krystalové roviny ke krystalové rovině je proti tomu relativně špatné.

Uměle vyrobenou formou grafitu je tzv. *skelný uhlík* (angl. *glassy carbon*), který se vyznačuje vysokou hustotou, nízkou pórovitostí a značnou chemickou a mechanickou odolností. V praxi se vyrábí přesně řízeným dlouhodobým vysokoteplotním (pyrolytickým) rozkladem organických látek na povrchu normálního grafitu. Díky mimořádným fyzikálním a chemickým vlastnostem skelného grafitu se jeho praktické využití stále rozšiřuje i přes jeho poměrně vysokou cenu. [58]

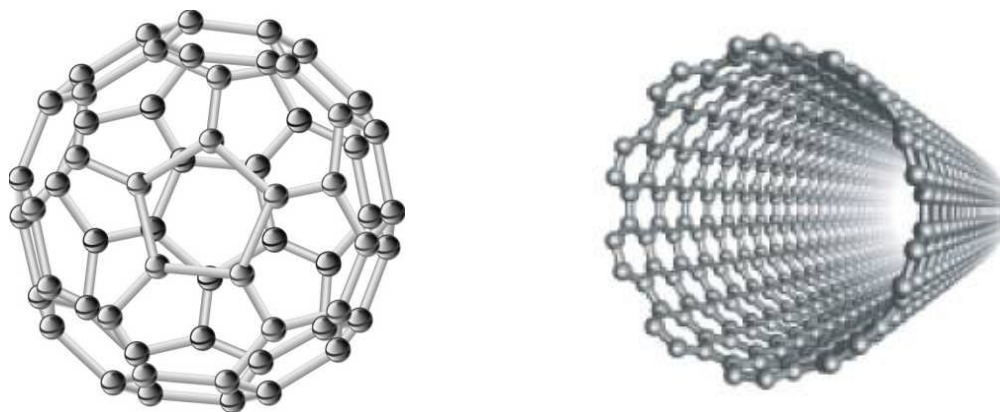


Obr. 3. Struktura grafitu, podle [58]

Kromě diamantu a grafitu existuje další uhlíková modifikace a tou jsou *karbyny* (*carbine*, *carbyne*). Karbyn je lineární alotropická forma uhlíku založená na sp^1 vazbě. V současnosti je známo více než šest karbynových modifikací, ale zatím nejvíce prozkoumané jsou karbyny α a β . Materiál povlakovaný karbyny (Carbylan) vykazuje vysoké trombo rezistentní vlastnosti a vynikající biokompatibilitu.[59]

Různé fáze uhlíku jsou nacházeny především v meteoritech: grafit, diamant, lonsdaleite (hexagonální diamant), a fullereny. Grafit je nejvíce běžná a nejvíce hojná forma. Nejvíce uhlíku je ve formě grafitu. Uhlíkový materiál v meteoritech se vyskytuje jako inkluze v silikátu, trolitu a kovu (FeNi). Uhlík, který je obsažen v *chondritech* (meteoritický kámen z křemičitanů s oblými granulemi - chondrulemi) může dosáhnout 3%, a diamantu v kovových meteoritech kolem 1% s celkové váhy meteoritu. Někdy se diamantová fáze vyskytuje jen ve stopovém množství (ppm). [60]

Fullereny jsou sférické struktury tvořené atomy uhlíku, rozměr této obří molekuly je kolem 0,7nm. Jméno získaly podle amerického architekta a vynálezce R.B.Fullera, který se proslavil podobnými stavebními konstrukcemi. Nejdůležitější z fullerenů jsou C_{60} , C_{50} a C_{70} obsahující 60, 50 a 70 atomů uhlíku. První, šedesáti atomový fullerén byl syntetizován a objeven v roce 1985 britským vědcem H.Krotem, který za tento objev dostal Nobelovu cenu za chemii. Shluky molekul C_{60} i další (C_{70} , C_{80}) vytvářejí krystaly, tzv. fullerity, které mají krychlovou symetrii. [61] Fullereny za normálních podmínek sublimují při teplotách nad 500°C . Výjimečné postavení má fullerén C_{60} jenž je nejkulatější, nejsymetričtější a z fullerenů nejznámější **Obr.4.A**. Významnou vlastností této molekuly je právě její souměrnost podle pětičetné osy, která je v krystalových strukturách „zakázána“, ale je obvyklá v biologických strukturách (bakteriofág, různé druhy virů) [62]



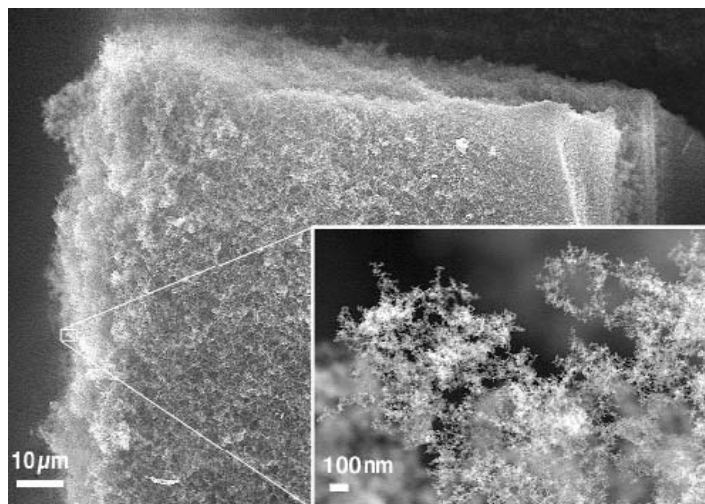
Obr.4. (A) Struktura fullerenu C_{60} (tzv. fulleren Buckminstera); (B) nanotrúbka.[62]

Nanotrúbice jsou vlastně podobné struktury, s tím rozdílem, že tvar molekuly místo koule připomíná válec, který může být libovolně dlouhý a vnitřní objem nemusí být uzavřený

Obr.4.B. Pro nanotechnologii jsou jak fullereny tak nanotrúbice velmi zajímavé, neboť lze tyto látky připravit v různých modifikacích s odlišnými vlastnostmi. U sférických fullerenových molekul lze například ovlivňovat vlastnosti tím, že je uvnitř uvězněn jiný atom. Tak lze změnit třeba hustotu, tepelnou kapacitu, teplotu tání a varu a přitom je látka co do chemických vlastností tatáž. Sférické fullereny byly již objeveny jak na Zemi tak v meteoritech.

Novou, poslední známou formu uhlíku se podařilo vytvořit týmu fyziků z australské národní laboratoře v Canbeře poté, co vystavili uhlíkový terčík v argonové atmosféře působení výkonného laserového pulsního systému. Mikrostruktura, jež se vytvořila po zahřátí na teplotu $10\,000\text{ }^{\circ}\text{C}$, připomíná jakési vzájemně pospojované síť uhlíkových trubiček, 5 nm dlouhých. Vědci tuto formu pevné látky nazvali *nanopěnou*

Obr.5. Bylo prokázáno, že vzorky připravené z uhlíkové nanopěny mohou vykazovat feromagnetické vlastnosti, což je u látky z čistého uhlíku překvapivé. Všechny ostatní známé formy uhlíku se totiž až dosud chovaly jako nemagnetické. Efekt za pokojové teploty vymizí po několika hodinách, ale může se udržet mnohem déle za nízkých teplot. [63,64]

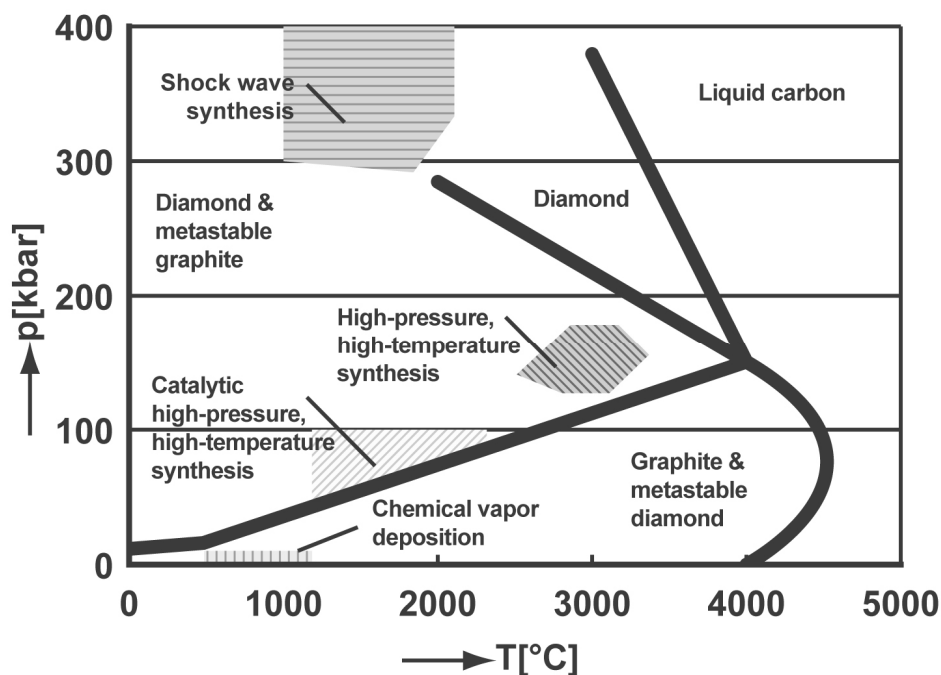


Obr. 5. Nanopěna, zatím poslední známá forma uhlíku. [63]

4.4 Diamant a depozice vrstev

Kombinace vlastností jako jsou extrémní tvrdost, vysoká tepelná vodivost, výborná infračervená transparentnost a pozoruhodné vlastnosti polovodiče umožňují, že se diamant stal jeden z nejvíce technologicky a vědecky hodnotných materiálů vůbec. Jeho vzácnost a vysoká cena motivovala vědce pokusit se duplikovat přírodní diamant a tedy diamant syntetizovat. Od doby kdy bylo dokázáno, že diamant je alotropní forma uhlíku, což prokázal v roce 1797 anglický chemik Smithson Tennant, se však dalších 150 let vědci, inženýři a snílci pokoušeli transformovat uhlík na diamant.

V roce 1954 Dr. Tracy Hall dokázal jako první reprodukovatelně syntetizovat diamant. Při pokojové teplotě a atmosferickém tlaku je grafit stabilní krystalickou formou uhlíku s entalpií jen o 2 KJ mol⁻¹ nižší než diamant. Diamant je termodynamicky stabilní v porovnání s grafitem jen při vysokých tlacích (>40kbar) a teplotách (>1300°C), to je evidentní z fázového diagramu uhlíku, **Obr. 6.** [65,66]



Obr. 6. Fázový diagram uhlíku s vyznačenými oblastmi odpovídající různým procesům syntézy diamantu, přepracováno podle H. Liu [65]

Ačkoli je přeměna termodynamicky proveditelná při relativně nízkých tlacích a teplotách, je zde velká kinetická bariéra a míra očividně klesá s rostoucím tlakem. Z tohoto důvodu předchozí pokusy přeměnit grafit na diamant jednoduchým zvýšením tlaku nebyly více jak sto let úspěšné, dokud nevznikly *high-pressure high-temperature (HPHT)* procesy. HPHT Syntéza diamantu v podstatě duplikuje přírodní proces přeměny grafitu na diamant za podmínek, kdy je diamant termodynamicky výsadní formou. Přímá přeměna grafitu na diamant ve statickém HPHT procesu vyžaduje vysoký tlak (>120 kbar) a vysokou teplotu ($\approx 3000^\circ\text{C}$) pro překonání kinetické bariéry a získání pozorovatelného stupně přeměny, což není ekonomicky schůdné. Těžkosti v přímé přeměně poháněly vývoj různých procesů k nižším teplotám a tlakům.

Zlom přišel až s objevem W.G.Eversola, diamant se mu na substrát podařilo deponovat z uhlovodíkového plynu nebo směsi CO/CO_2 pomocí metody *CVD* za nízkých tlaků a teplot, kdy je diamant ve vztahu ke grafitu metastabilní. [66]

Od té doby bylo objeveno a zdokonaleno mnoho metod přípravy diamantu podobných vrstev nebo vrstev na bázi uhlíku.

Obecně se tenké vrstvy obvykle připravují buď z pevné fáze nebo z plynné fáze. V prvním případě se vrstvy vytvářejí odpařováním nebo rozprašováním pevného materiálu (targetu) nebo nástřiku. V druhém případě se vrstvy a prášky vytváří nitridací, oxidací, pyrolýzou, chemickou redukcí nebo plazmochemickou syntézou.

Pro vytváření tenkých vrstev a prášků bylo vyvinuto velké množství metod. V podstatě je lze rozdělit do tří základních skupin:

- metody chemické, označované jako CVD
(chemical vapour deposition) s pracovními teplotami 700 - 1500 °C
- metody fyzikální, označované jako PVD
(physical vapour deposition) pracovní teploty pod 500 °C
- metody fyzikálně-chemické, označované jako PECVD
(plasma enhanced CVD) nebo PACVD (plasma assisted CVD)
pracovní teploty pod 600 °C

Metody všech tří skupin mají řadu modifikací, které umožňují připravovat vrstvy předepsaných vlastností na substrátech (předmětech) různých geometrií.

4.4.1 Depoziční systémy

Plazmová depozice vrstev a modifikace povrchu je silně závislá na volbě vhodného typu výboje. Vhodný typ výboje často rozhoduje o depozičních parametrech, které pozitivně ovlivňují výsledné vlastnosti deponovaných vrstev a modifikovaných povrchů nebo naopak může potlačit vliv některých negativních depozičních parametrů. Podle geometrické konfigurace reaktoru lze reaktory rozdělit na tři hlavní typy: [67]

- s vnitřními elektrodami
- s vnějšími elektrodami
- bezelektrodový.

Reaktor s vnitřními elektrodami tvoří většinou dvě rovnoběžné rovinné elektrody, které jsou umístěny uvnitř reaktoru. V tomto uspořádání je možno generovat DC výboj nebo RF kapacitní výboj. V reaktorech s vnějšími elektrodami lze provozovat kapacitní i induktivní RF výboje. V bezelektrodových reaktorech se plyn excituje při průchodu rezonanční zónou, kde dochází ke generování výboje, nejčastěji mikrovlnného nebo RF. Existuje mnoho různých variant a kombinací. [68]

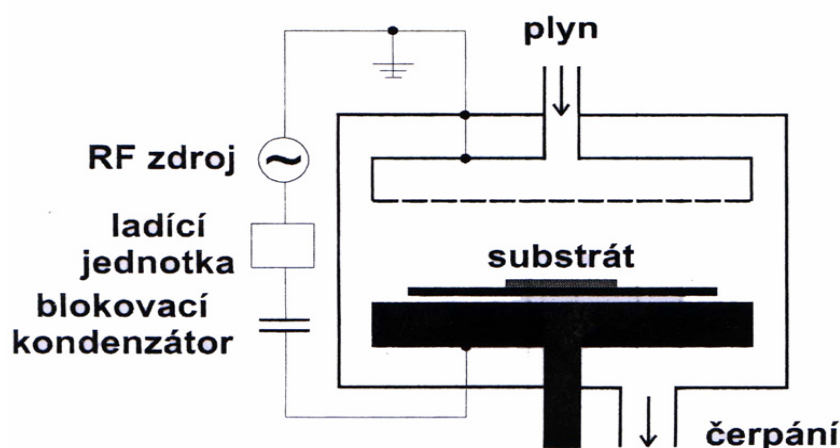
4.4.1.1 DC výboj

U DC výbojů je jedna elektroda zapojena jako katoda a druhá jako anoda. Plášť reaktoru může být vyroben z vodivého nebo nevodivého materiálu. V případě vodivých materiálů bývá většinou uzemněn. Substrát je umístěn na samostatném držáku mezi elektrodami nebo na záporné elektrodě, kterou tvoří katoda. Záporné předpětí urychluje kladné ionty a tím způsobuje iontový bombard, kterým lze řídit strukturu rostoucí vrstvy. Režim zdroje může být spojitý nebo pulzní.

Klasický DC výboj se většinou používá pro modifikaci polymerních povrchů, kde zvyšuje smáčivost povrchu. Pro plazmovou modifikaci není DC výboj příliš efektivní, protože neumožňuje dosáhnout dostatečně vysoký stupeň ionizace plazmatu potřebný k docílení optimální rychlosti procesu. Existují různé metody, jak zvýšit účinnost DC výbojů, například pomocí přídavného magnetického pole. [69] Mnohem větší perspektivu na zavedení do průmyslu mají pulzní DC výboje, kde pomocí vysokoenergetických pulzů dochází k účinné ionizaci a tím i dosažení optimální rychlosti procesu. [68]

4.4.1.2 RF – Kapacitní výboj

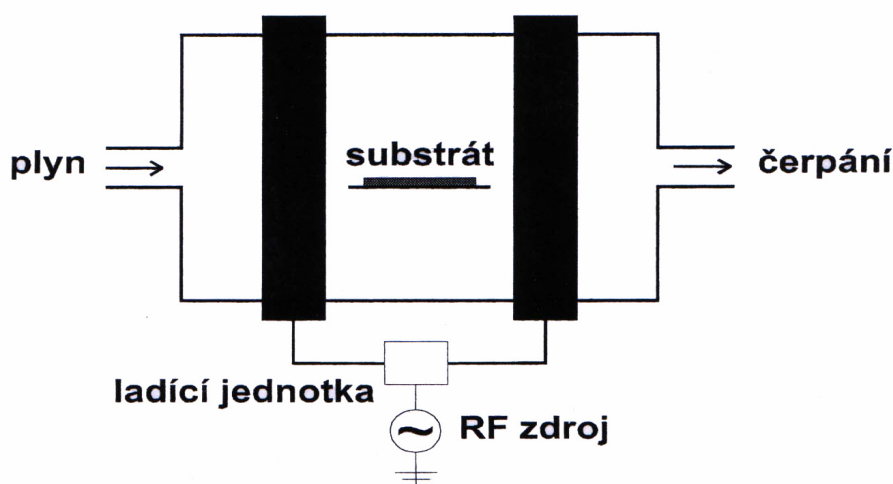
Pro průmyslové procesy depozice vrstev, kde rozhoduje především depoziční rychlost a homogenita vrstev, se používají kapacitní výboje, které umožňují dosažení vyššího stupně ionizace plazmatu, než umožňují klasické DC výboje. Z toho důvodu se již delší dobu používají pro plazmovou polymerizaci RF kapacitní výboje. Lze je provozovat jak v reaktorech s vnitřními elektrodami tak v reaktorech s vnějšími elektrodami.



Obr. 7. Kapacitně vázaný reaktor s vnitřními elektrodami. [68]

Reaktor s vnitřními elektrodami **Obr.7.** tvoří dvě rovnoběžné rovinné elektrody, kde je jedna elektroda zapojená k RF zdroji a druhá elektroda je uzemněna. Plášť reaktoru může být z vodivého i nevodivého materiálu. Pokud je plášť z vodivého materiálu bývá většinou propojen s uzemněnou elektrodou. Substrát je umístěn na samostatném držáku mezi elektrodami nebo na RF elektrodě. Na této elektrodě se vytváří samovolné záporné předpětí, které je udržováno pomocí blokovacího kondenzátoru a je závislé na dodávaném příkonu. V případě nevodivých substrátů není kondenzátor zapotřebí, protože vzniká kapacitní vazba mezi tímto substrátem a RF elektrodou. K docílení maximálního přenosu energie do výboje se používá ladící jednotka, která pomocí nastavitelné kapacity a indukce přizpůsobuje přenos RF signálu do plazmatu. [68]

Nevýhodou tohoto uspořádání jsou kovové elektrody na záporném potenciálu vystavené vlivu plazmatu, které mohou být rozprašovány a tím snižovat čistotu procesu. Proto se v některých aplikacích, které vyžadují vysoký stupeň čistoty nahrazují vnitřní elektrody vnějšími. Reaktor s vnějšími elektrodami **Obr. 8** tvoří ploché kovové elektrody obepínající reaktor zcela nebo z části. Plášť reaktoru je vyroben ze skla nebo jiného nevodivého materiálu a substrát je umístěn na samostatném držáku mezi elektrodami. [68]



Obr.8. Kapacitně vázaný reaktor s vnějšími elektrodami. [68]

Zapojení elektrod u RF výbojů s vnitřními i vnějšími elektrodami může být symetrické nebo nesymetrické. U nesymetrického zapojení je jedna elektroda zapojena k RF zdroji a druhá je uzemněna. V symetrickém zapojení jsou elektrody zapojeny k RF zdroji, ale každá s opačnou fází. Pro generaci výboje se používá většinou frekvence 13,56 MHz.

Od dosud používaných kapacitních výbojů se začíná přecházet k induktivním a mikrovlnným výbojům. Omezení kapacitních výbojů představuje především přenos energie do plazmy pomocí kapacitní vazby. Z toho důvodu se zaměřil zájem na nízkotlaké plazmové výboje, které umožňují dosahovat vyšší stupeň ionizace. U těchto výbojů přenos energie umožňuje nekapacitní vazba, která zajišťuje zachování nízkého napětí v příkatodové oblasti výboje u elektrod a stěn reaktoru. Potenciál plazmatu a tím i energie urychlených iontů se nachází mezi 20 – 40 V, a proto se větší část dodávané energie využívá na ionizaci plazmatu než je tomu u kapacitních výbojů. [70] V **Tab.1.** jsou porovnány parametry kapacitního výboje s parametry induktivního a mikrovlnného výboje. [68]

Tab.1. Srovnání parametrů kapacitního, induktivního a mikrovlnného výboje. [70]

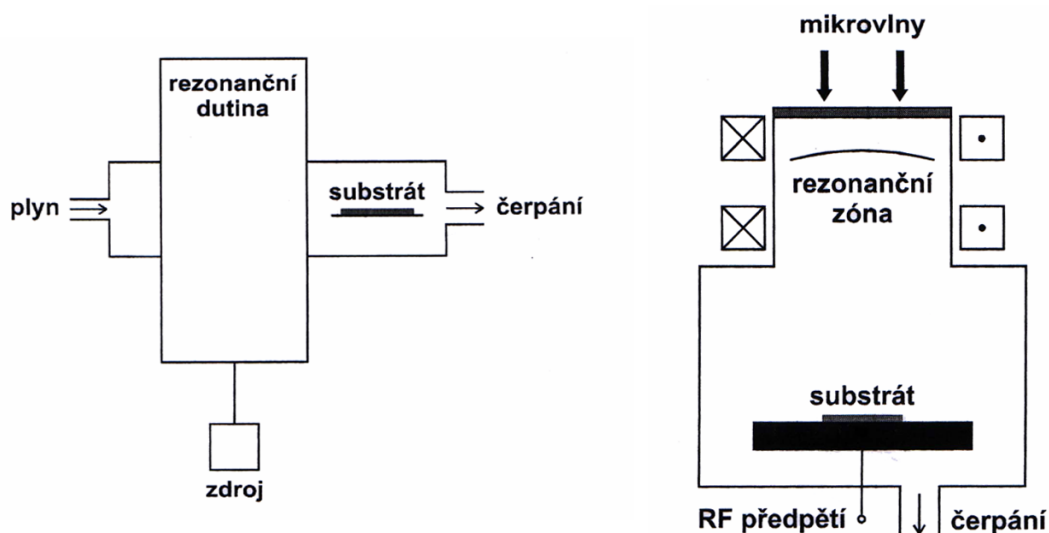
| Parametry | Kapacitní výboj (RF) | Mikrovlnný výboj (MW) |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Tlak [Pa] | 0,1 - 10 | 0,005 – 0,5 |
| Příkon [W] | 50 - 2000 | 100 - 5000 |
| Frekvence [MHz] | 0,05 – 13,56 | 0 - 2450 |
| Magnetické pole [kG] | 0 | 0 - 1 |
| Hustota plazmatu [cm ⁻³] | 10 ⁹ – 10 ¹¹ | 10 ¹⁰ - 10 ¹² |
| Teplota elektronů [V] | 1 - 5 | 2 - 7 |
| Ionizace | 10 ⁻⁶ - 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ - 10 ⁻¹ |

4.4.1.3 Mikrovlnný výboj

U mikrovlnných výbojů lze dosáhnout za nízkého tlaku vysokého stupně ionizace viz. **Tab.1.** Pro mikrovlnný výboj se používá bezelektroodový reaktor, který může být vyroben z vodivého i nevodivého materiálu. Ke generaci plazmatu slouží mikrovlnný zdroj pracující na frekvenci 2,45 GHz. Nejjednodušší uspořádání reaktoru **Obr. 9.A** se skládá z rezonanční dutiny, kterou proudí pracovní plyn. Při průchodu plynu rezonanční dutinou dochází k jeho excitaci a dojde k zapálení výboje. Generované plazma je vyfukováno do komory, kde dochází k leptání, čištění nebo modifikaci povrchu působením chemicky aktivních částic, zejména volných radikálů. [67] Upravovaný povrch není vystaven přímému vlivu plazmatu a proto nehrozí poškození tepelně citlivých materiálů.

Pro průmyslové aplikace se používá uspořádání, ve kterém jsou mikrovlny přenášeny do reaktoru skrz dielektrické okénko. Do reaktoru je umístěna například plastová láhev nebo

nádrž a tlak pracovní směsi uvnitř je nižší než vně. Tím dojde k zapálení výboje pouze uvnitř láhve nebo nádrže. Jedná-li se o členitější tvar, nastává problém s homogenitou. Potom je potřeba použít více vstupních okének na různých místech a optimalizovat rozložení plazmatu v reaktoru. [68]



Obr.9 (A) Mikrovlenný bezelektrodový reaktor **(B)** mikrovlenný ECR reaktor. [68]

V uspořádání s přidavným magnetickým polem **Obr.9.B** je generování plazmou zvýšeno pomocí elektronově cyklotronové rezonance ECR (*Electron Cyclotron Resonance*) [70,71]. Základní podmínkou je dostatečně nízký tlak, aby byl pohyb elektronů bezesrážkový. Pro elektromagnetické pole s typickou mikrovlnou frekvencí $f = 2,45 \text{ GHz}$ bude elektronová rezonance ve fázi, pokud se hodnota rezonančního magnetického pohybuje kolem $B \approx 875 \text{ G}$. Výsledkem je, že v každém cyklu elektron zvýší svoji energii. Jako zdroj ECR se používá jedna nebo více elektromagnetických cívek, umístěných okolo cylindrické komory, která generují axiálně měnitelné magnetické pole. Mikrovlenný signál vstupuje do této komory skrz dielektrické okénko a v rezonanční zóně dochází k maximálnímu přenosu energie do plazmatu. [68]

Při depozici vrstev v tomto uspořádání je podstatná vzdálenost od rezonanční zóny. S rostoucí vzdáleností klesá stupeň ionizace a snižuje se depoziční rychlost. Pro průmyslové využití, jako je povlakování, může nastat problém s homogenitou vrstev. Je proto nutné použít více mikrovlenných zdrojů. [68]

4.4.2 Diamond Like Carbon (DLC)

Uhlík tvoří velké množství krystalů a neuspořádaných struktur, protože je schopen existovat ve třech hybridizacích sp^3 , sp^2 a sp^1 . *Diamond-like carbon (DLC)* je metastabilní forma amorfního uhlíku obsahující převážně vazby sp^3 . Vyznačuje se vysokou tvrdostí, chemickou inertností, optickou transparentností, je to polovodič a má významné biokompatibilní vlastnosti.

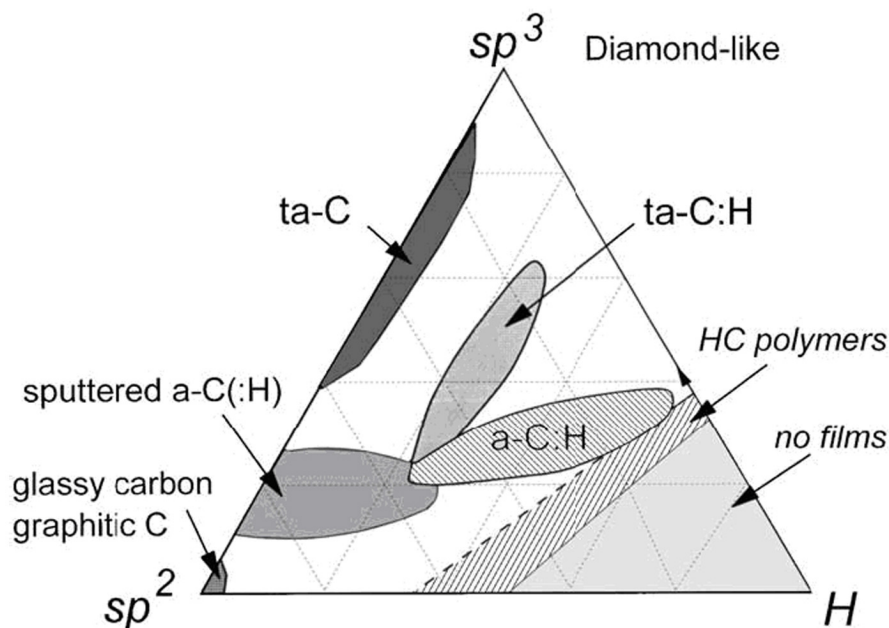
DLC má některé extrémní vlastnosti podobné diamantu, jako je již zmiňovaná tvrdost, modul pružnosti a chemická inertnost, ale ty jsou dosaženy v izotropní neuspořádané tenké vrstvě bez hranic zrn. Je daleko levnější než diamant, což je velká výhoda pro mnoho aplikací. Typické vlastnosti různých forem DLC jsou porovnány k diamantu a grafitu v **Tab.2**. [66]

Tab. 2 Přehled hlavních vlastností amorfního uhlíku v porovnání s diamantem, grafitem, C_{60} a polyetylénem. [66]

| | sp^3 | H [%] | Hustota [$g \cdot cm^{-3}$] | Gap [eV] | Tvrdost [GPa] |
|----------------------------|--------|-------|-------------------------------|----------|---------------|
| Diamant | 100 | 0 | 3,515 | 55 | 100 |
| Grafit | 0 | 0 | 2,267 | 0 | - |
| C_{60} | 0 | 0 | - | 1,6 | - |
| Skelný C | 0 | 0 | 1,3 – 1,55 | 0,01 | 3 |
| Napařený C | 0 | 0 | 1,9 | 0,4-0,7 | 3 |
| Naprášený C | 5 | 0 | 2,2 | 0,5 | - |
| ta-C | 80-88 | 0 | 3,1 | 2,5 | 80 |
| a-C:H hard | 40 | 30-40 | 1,6-2,2 | 1,1-1,7 | 10-20 |
| a-C:H soft | 60 | 40-50 | 1,2-1,6 | 1,7-4 | <10 |
| ta-C:H | 70 | 30 | 2,4 | 2,0-2,5 | 50 |
| Polyetylén | 100 | 67 | 0,92 | 6 | 0,01 |

Vazba sp^3 vazba uděluje DLC mnoho prospěšných vlastností samotného diamantu, jako je mechanická tvrdost, chemická a elektrochemická inertnost a široký zakázaný pás. *Diamond-like carbon* je název, který zahrnuje mnoho forem uhlíku, které obsahují jak grafitické tak diamantové vazby. DLC se nemusí skládat pouze z amorfni fáze (a-C), ale také z hydrogenované amorfni fáze uhlíku a-C:H. Je vhodné ukázat složení mnoha forem

amorfních C-H sloučenin v ternárním fázovém diagramu jako je na **Obr.10**, jako první ho použil Jacob and Moller. [72]



Obr.10. Ternární fázový diagram vazeb v amorfních C-H sloučeninách [72,66]

Na levé spodní straně se vyskytuje mnoho amorfních fází a-C s neuspořádaným grafitickým složením, jako jsou saze, skelný uhlík, napařovaný amorfni uhlík. Dva uhlovodíkové polymery polyetylén $(CH_2)_n$ a polyacetylen $(CH)_n$ definují hranice trojúhelníku v pravém rohu diagramu, za kterými se vazba C-C tvořit nemůže a vzniká jen molekulová forma.

Depoziční metody jsou vytvářeny k produkci amorfních fází uhlíku a-C se zvýšenou mírou sp^3 vazby. Naprašování může do určité míry zvýšit poměr vazby od sp^2 k sp^3 . Pokud podíl sp^3 vazby dosahuje vyššího stupně, označil McKenzie [73] a-C jako tetraedrický amorfni uhlík (ta-C), na rozdíl od sp^2 a-C.

Depoziční metody, jako je například *Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition (PECVD)* [74], umožňují dosáhnout vnitřní oblasti diagramu, kde lze vytvořit a-C:H. Přestože je *diamantu podobný*, je z **Obr.10** zřejmé, že obsah sp^3 vazby není vlastně tak veliký, přičemž jeho obsah vodíku je poměrně velký.

Takže materiál s vyšším obsahem sp^3 vazby a menším obsahem vodíku, který může být vytvořen například metodou *High Plasma Density PECVD*, se nazývá hydrogenovaný tetraedrický amorfni uhlík (ta-C:H); dle Weiler a kolektiv. [75]

4.4.3 *Nanocrystalline diamond (NCD)*

Vrstvy nanokrystalického diamantu vytvářené metodami CVD mají díky své extrémní tvrdosti, ořeruvzdornosti, malé frikci a biokompatibilním vlastnostem velký potenciál pro použití v oblasti biomedicínských implantátů.

Vrstvy nanokrystalického diamantu (NCD) vykazují dobrou hemokompatibilitu a jsou například deponovány na biomedicínské aplikace, jež jsou ve stálém kontaktu s krví, jako jsou např. umělé srdeční chlopně. [76,77]

Díky malé zrnitosti nanokrystalických diamantových vrstev je převážná část uhlíkových atomů situována na hranicích zrn. Zdá se, že právě hranice zrn jsou důležité (zodpovědné) za absorpci a rozptyl světla v těchto vrstvách, jejich elektrickou vodivost a emisní vlastnosti. [78] Proto jsou vrstvy NCD široce používány i v oblasti elektronických zařízení (např. biosenzory). [79]

Bylo prokázáno, že nanokrystalický diamant (pravděpodobně kvůli obsahu velkého množství vysoko energetických hranic zrn) může být díky odlišnému množství vazeb napříč hranicemi zrn a stupněm sp hybridizace, mechanicky silnější než hrubší diamant (obsahující vyšší podíl nízkoenergetických hranic zrn) nebo dokonce perfektní krystal diamantu. [78]

Je možné získat nanokompozitní vrstvy složené z nano-diamantových (a pravděpodobně také grafitických) zrn uložených v okolní amorfní matrici. Takové vrstvy jsou-li náležitě vytvořeny, mohou být pozoruhodně tvrdé a pevné. Dané nanokompozitní filmy, založené čistě na uhlíku, byly vytvořeny žíháním po depozici vrstvy *diamond-like amorphous carbon* (a-C). Výsledkem byly oblasti o velké hustotě a-C usazené v a-C matrici s menší hustotou. Díky nanokompozitní struktuře se zvýšila tvrdost o patnáct procent (k 80GPa). [77,80]

4.4.3.1 Mechanizmy nukleace diamantu

Homogenní nukleace diamantu v plynné fázi a její přínos pro různé depoziční procesy je málo prozkoumána. Jen omezený počet experimentů bylo spojeno s výzkumem homogenní nukleace při atmosferických a subatmosferických tlacích. Počet diamantových částic získaných z plynné fáze je velmi malý v porovnání s typickými hustotami nukleačních zárodků na povrchu. Mechanismus homogenní nukleace tudíž nemůže vysvětlit velké množství nukleačních zárodků pozorovaných na různých substrátech a za různých povrchových před-úprav. Zda a jak by se diamantové částice formované v plynné fázi mohly stát na povrchu substrátu základem pro následný růst diamantové vrstvy zůstává nejasné. Pro spontánní (ne-epitaxní) nukleaci na povrchu musejí být splněny dvě podmínky:

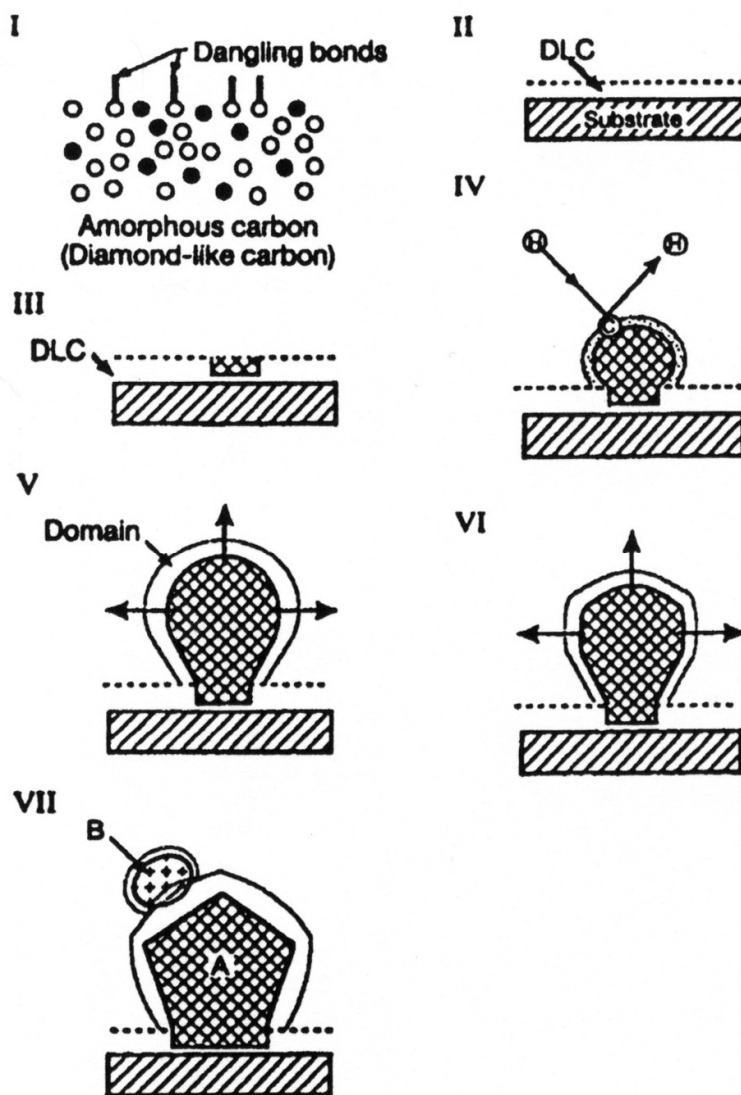
- saturace uhlíku povrchem substrátu a
- prezenze vysokoenergetických stavů (nezaplněné valence)

Nukleace diamantu na nediamantových substrátech probíhá většinou na mezivrstvách a-C, DLC, kovových karbidů nebo grafitových vrstvách formovaných na rozhraní diamant / substrát díky chemickým interakcím aktivovaných plynných částic s povrchem substrátu během inkubační periody. Příklad mechanismu nukleace a růstu diamantu na přechodové vrstvě amorfního uhlíku je zobrazen na **Obr.11.** [65]

Přechodové vrstvy zajišťují nukleační místa pro růst diamantových krystalů a poskytují možnost kontroly morfologie, orientace a textury tenkých diamantových vrstev. Tvorba mezivrstev je nutným krokem ve spontánních nukleačních procesech diamantu na nediamantových substrátech, ale samotná není postačující. Povrchová saturace uhlíku a defekty nebo vysoko-energetické stavy vytváří vhodné podmínky pro nukleaci diamantu na mezivrstvách. Tvorba přechodových vrstev a jejich rychlost růstu nezávisí jen na materiálu substrátu a metodách předúprav, ale také na depozičních podmínkách. Odlišné přechodné vrstvy se mohou tvořit na různých substrátech při různých rychlostech a při odlišném složení plynů nebo při různých teplotách substrátů naopak můžeme vytvářet různé přechodové vrstvy na stejném substrátu. [65]

Malý C/H poměr a/nebo vysoká teplota substrátu může podporovat růst karbidů, zatímco vysoký poměr C/H a/nebo nízká teplota substrátu může vést k tvorbě a-C nebo DLC nebo dokonce k přímé nukleaci a růstu diamantových vrstev na povrchu substrátu. Tloušťky

přechodových vrstev jsou závislé na těchto faktorech a mohou být v rozmezí od několika angstrémů až po několik mikrometrů. Jsou nutné předchozí důkladné analýzy k určení velikosti, molekulární a strukturní přípravy nukleačních míst a zajištění stabilní nukleace pokud jde o jejich závislost na podmínkách povrchu substrátu a depozičních parametrech. [65]



Obr.11. Schéma nukleačního mechanismu: růst diamantu na přechodové vrstvě DLC (amorfního uhlíku). (I) Tvorba uhlíkových klastrů na povrchu substrátu a změna vazebné struktury sp^1 na sp^2 . (II) Změna sp^2 na sp^3 . (III) Tvorba amorfnní fáze. (IV-VI) Růst a krystalizace diamantových krystalků. (VII) Sekundární nukleace a růst diamantu. [65]

4.4.4 Diamond powder particles (DPP)

Různé medicínské implantáty jsou povlakovány vrstvou nanokrystalického diamantu (NCD), která tvoří difúzní bariéru mezi implantátem a lidským tělem. Mnoho studií prokázalo biokompatibilitu NCD. [81]

Diamond Powder Particles (DPP) jsou v podstatě rozšířeným povrchem tzv. „extended surface“ vrstvy NCD. [81] Diamond Powder Particles jsou částice nanokrystalického diamantu, které lze vytvořit metodou detonační syntézy [87] či metodami RF PCVD a nebo MW/ RF PCVD. Bylo prokázáno, že tyto částice jsou nejen biokompatibilní k lidskému tělu, ale co je především důležité - jsou bioaktivní. Vliv DPP na biochemické procesy v živých organizmech je založen na specifických, neobvyklých vlastnostech diamantu. Tato biologická aktivita DPP se projevuje inhibicí oxidativního stresu způsobeného volnými radikály in vitro. [85,86]

Zdá se, že DPP by mohly být použity například jako alternativní metoda léčby hemolytické anémie (anemia haemolytica). [82,83] Hemolýza zjednodušeně znamená předčasná destrukce erytrocytů. Buněčné membrány červených krvinek mohou být narušeny mechanismem oxidativního stresu (poškození zprostředkované volnými radikály), což je základ vzniku procesu hemolýzy.

K.Mitura a kolektiv [82] studovala účinky nanokrystalických částic diamantu na hemolýzu lidských erytrocytů indukovanou 2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloridem (AAPH). [82] Pro tuto studii byly použity diamantové prášky vytvořené detonační metodou v Rusku. [84] Erytrocyty (hematocrit 1%) byly exponovány 50mM AAPH v roztoku PBS (Phosphate Buffered Saline) při teplotě 310°K s cílem vyvolat hemolýzu. Do reakce byla dodána suspenze DPP v množství $1 \times 10^{-3} \text{ g} / 1 \times 10^{-3} \text{ l}$. Léčebný čas hemolýzy byl monitorován kvantitativní metodou a byla měřena absorpce hemoglobinu. Přítomné Diamond Powder Particles výrazně snížily úroveň hemolýzy indukované AAPH. Tento efekt se zdá být díky reakci nanokrystalického diamantu s peroxylovými radikály. Diamond Powder Particles jsou tedy při testech in vitro s erytrocyty velmi biologicky aktivní na molekulové úrovni. [82]

Shugalei a kolektiv [87] ve své studii prokazují, že nanodiamanty vyrobené detonační syntézou patří do skupiny účinných syntetických antioxidantů. Jejich antioxidační aktivita je získána díky funkčním skupinám jako jsou -OH, -NH₂, -CH₃OH, -CO(NH₂) jež jsou přítomny na povrchu klastrů.

Antioxidační aktivita nanodiamantů byla posuzována přes schopnost potlačit iniciaci chemiluminiscence. Aktivita nanodiamantů byla porovnána s aktivitou rostlinných

antioxidantů quercetine a flavonole. Účinky potlačení iniciované chemiluminiscence v suspenzi lipozomů pro nanodiamaty, quercetine a flavonole jsou velmi podobné a demonstrují vysokou antioxidační aktivitu nanodiamantů. [87]

4.5 Povrchová energie

Povrchová energie tedy smáčivost či nesmáčivost povrchu je další důležitou vlastností povrchu spadající mezi soubor sledovaných vlastností povrchů implantátů a medicínských nástrojů.

Povrchová vrstva se snaží stáhnout na nejmenší velikost, je v ní tedy napětí, které nazýváme *povrchové napětí* γ (síla v rovině povrchu, kterou působí jednotková délka mezifáze proti snahám o zvětšení).

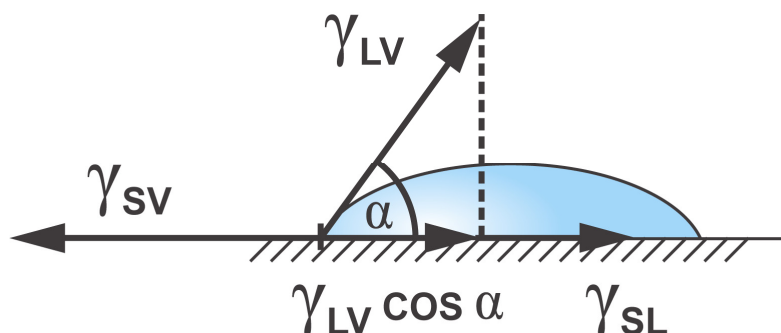
Povrchová energie je definována jako energie, kterou je třeba dodat k zvětšení mezifáze o jednotkovou plochu. Povrchové napětí i povrchová energie popisují stejný jev a mají i stejný rozměr ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}=\text{J}\cdot\text{m}^{-2}=\text{kg}\cdot\text{s}^{-2}$). Termín „povrchové napětí“ se používá častěji pro kapalinová mezifáze (LL, LG). „Povrchová energie“ se používá zejména při popisu mezifází tvořícího povrch pevné látky (SS, SL, SG). Oba termíny jsou z fyzikálního hlediska zaměnitelné. Pokud je povrchové napětí kladné, je požadována kladná práce k rozšíření povrchu - kapičky kapaliny spontánně inklinují k tvorbě kulovitých tvarů - minimální plocha povrchu. Pokud se povrchová energie zmenšuje k nule nebo se stává zápornou, neexistuje odpor k neomezené expanzi povrchu. Tato situace odpovídá např. kontaktu dvou vzájemně mísitelných kapalin.

Na molekulu uvnitř izotropického tělesa působí okolní molekuly silami přibližně rovnoměrně ve všech směrech. Výsledné působení je tedy možné uvažovat jako nulové. Odlišné je ale působení na molekuly či atomy na volném povrchu. Výsledná síla, při zanedbání působení molekul okolního plynu, působí na molekulu volného povrchu směrem dovnitř tělesa. Díky tomuto nerovnovážnému působení se zde vytvoří asymetrické silové pole a přebytek energie. Tento energetický přebytek je označen jako volná povrchová energie [88,89,90].

Každý volný povrch je charakterizován určitou hodnotou povrchové energie. Tato hodnota hraje velice důležitou roli při interakci dvou povrchů a je rozhodující pro různé technologie povrchových úprav. Systematické studium povrchové energie bylo zahájeno Youngem a vychází z následující rovnice [89].

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SV} - \gamma_{LV} \cdot \cos \alpha \quad (4.1)$$

kde γ_{SL} představuje povrchovou energii rozhraní kapalina pevná fáze, γ_{SV} a γ_{LV} jsou povrchové energie kapaliny a pevné fáze v rovnováze s parami přítomnými na povrchu a α je kontaktní úhel mezi kapalinou a pevnou fází, viz. **Obr. 12**.



Obr. 12. Schéma rozhraní kapalina - pevná fáze, podle [116].

Rozložení povrchové energie γ na jednotlivé složky bylo navrženo Fowkem [91,92]. Zjistil, že povrchovou energii lze rozložit do jednotlivých složek, představovaných následující rovnicí

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p + \gamma^{\text{ind}} + \gamma^H + \dots \quad (4.2)$$

kde horní indexy označují d – disperzní (London), p – dipól-dipól (Keesom), ind – induktivní (Debye) a H – vodíkovou vazbu. Fowke a spolupracovníci [93,94] zjednodušili navržené rozdělení na dvě nejdůležitější složky

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p \quad (4.3)$$

$$\gamma^p = \gamma^p + \gamma^{\text{ind}} + \gamma^H + \dots \quad (4.4)$$

kde γ^p označuje nedisperzní (polární) složku povrchové energie [88].

Pokud dojde k adheznímu spojení dvou ideálně hladkých volných povrchů, tyto povrchy zaniknou a vytvoří se nové rozhraní. Výsledná hodnota povrchové energie vzniklého rozhraní poklesne. Pokud nedojde k vytvoření chemických vazeb mezi atomy, to znamená, že dojde k vytvoření pouze disperzních a polárních vazeb, je tento pokles povrchové energie definován jako termodynamická adhezní práce w_A [95]. Pokud dojde k vytvoření chemických vazeb nebo pokud je povrch hrubý a dochází zde k mechanickému spojení povrchů, je pokles povrchové energie výrazně rozdílný od w_A . Vztah mezi povrchovou energií a adhezní prací pro kapalinu (L) na povrchu pevného tělesa (S) obklopeného parami (V) vyjadřuje Dupreho rovnice, [95]

$$w_A = \gamma_S + \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (4.5)$$

kde γ je povrchová energie a dolní indexy označují příslušnost k povrchům či rozhraním. Po úpravě rovnice (4.5) pro rozhraní mezi dvěma pevnými tělesy a, b dostaneme následující rovnici [95].

$$w_A = \gamma_a + \gamma_b - \gamma_{ab} \quad (4.6)$$

Povrchová energie rozhraní γ_{ab} je definována teorií, kterou vypracovali Owens a Wendt [89], Kealble a Uy [96] a Wu [97], a je vyjádřena rovnicí

$$\gamma_{ab} = \gamma_a + \gamma_b - 2 \cdot \sqrt{(\gamma_a^d \cdot \gamma_b^d)} - 2 \cdot \sqrt{(\gamma_a^P \cdot \gamma_b^P)} \quad (4.7)$$

Při zkombinování rovnic (4.6) a (4.7) dostane pro výpočet adhezni práce následující vztah [95].

$$w_A = 2 \cdot \sqrt{(\gamma_a^d \cdot \gamma_b^d)} + 2 \cdot \sqrt{(\gamma_a^P \cdot \gamma_b^P)} \quad (4.8)$$

Pro výpočet polární a disperzní složky povrchové energie lze využít rovnici (4.9), která vznikne kombinací Youngovy rovnice (4.1) a rovnice (4.7) upravené pro rozhraní kapaliny a pevného tělesa.

$$1 + \cos \alpha = \frac{2 \cdot \sqrt{(\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d)}}{\gamma_L} + \frac{2 \cdot \sqrt{(\gamma_S^P \cdot \gamma_L^P)}}{\gamma_L} \quad (4.9)$$

$$\gamma_L = \gamma_L^d + \gamma_L^P \quad (4.10)$$

Použijeme-li dvě kapaliny L_i , L_j na stejný povrch a změříme kontaktní úhly α_i , α_j , dostaneme sérii rovnic (4.11) a (4.12). Pokud známe hodnoty disperzních a polárních složek použitých kapalin, lze vypočítat jednotlivé složky povrchové energie pevné látky γ_S^d a γ_S^P . Řešení je vyjádřeno následujícími vztahy [95].

$$\gamma_S^d = \frac{\left| \begin{array}{cc} 0,5 \cdot (1 + \cos \alpha_i) \cdot \gamma_{Li} & \sqrt{\gamma_{Li}^P} \\ 0,5 \cdot (1 + \cos \alpha_j) \cdot \gamma_{Lj} & \sqrt{\gamma_{Lj}^P} \end{array} \right|^2}{\Delta^2} \quad (4.11)$$

$$\gamma_S^P = \frac{\left| \begin{array}{cc} 0,5 \cdot (1 + \cos \alpha_i) \cdot \gamma_{Li} & \sqrt{\gamma_{Li}^d} \\ 0,5 \cdot (1 + \cos \alpha_j) \cdot \gamma_{Lj} & \sqrt{\gamma_{Lj}^d} \end{array} \right|^2}{\Delta^2} \quad (4.12)$$

$$\Delta = \left| \frac{\sqrt{\gamma_{Li}^d}}{\sqrt{\gamma_{Lj}^d}} - \frac{\sqrt{\gamma_{Li}^P}}{\sqrt{\gamma_{Lj}^P}} \right| \quad (4.13)$$

Tato metoda je dobře použitelná pro povrchy organických látek s nízkou povrchovou energií (<100 mJ/m²), ale při použití pro látky s vysokou povrchovou energií, jako jsou čisté kovy nebo oxidy, vede ke značné chybě. Důvodem je zanedbání vlivu adsorbovaných par do povrchu. Adsorbované páry snižují povrchovou energii a zvětšují tak kontaktní úhel. Množství adsorbovaných par se zvyšuje se zvyšující se povrchovou energií. Pro vysokoenergetické povrchy tedy nelze tento vliv zanedbat [98]. Rovnice (4.9) má v takovémto případě tvar [95].

$$1 + \cos \alpha = \frac{2 \cdot \sqrt{(\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d)}}{\gamma_L} + \frac{2 \cdot \sqrt{(\gamma_S^P \cdot \gamma_L^P)}}{\gamma_L} + \frac{\pi_e}{\gamma_L} \quad (4.14)$$

Parametr π_e je tzv. rovnovážný „spreading“ tlak, jeho velikost je závislá na použité kapalině a je zanedbatelný pro organické látky. Zavedení tohoto parametru znemožňuje použití výše ukázaného řešení. Přibližné opravné metody jsou uvedeny v práci [99].

4.5.1 Způsoby měření povrchového napětí pevných látek

Přímé měření povrchové energie pro kapaliny je relativně snadné [89,100,101], ale přímé měření pro pevné látky je velmi problematické. Proto se pro toto měření používají převážně nepřímé a srovnávací metody.

4.5.1.1 Měřicí tinktury

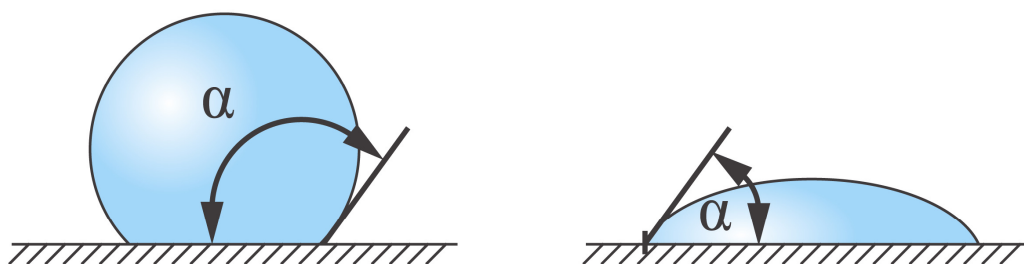
Pro rychlé zjišťování hodnoty povrchového napětí je vhodná metoda pomocí testovacích kapalin, např. Testing Ink firmy Arcotec®. Tyto testovací kapaliny mají přesně definované hodnoty kritického povrchového napětí. Hodnota povrchového napětí se docílí přesným smícháním kapalin, jako jsou čirý Ethylenglycol-monoethylether (Cellosolve), Formamid, Metanol a voda.

Způsob měření tinkturami je definován normou DIN 53 364. Na měřený povrch se nanese testovací kapalina o určité hodnotě povrchového napětí v podobě tenkého filmu. Pokud se tento film do 2 sekund po nanesení dále rozlije, má měřený povrch větší povrchové napětí než testovací kapalina. Volíme kapalinu s vyšší hodnotou povrchového napětí a test

opakujeme. Pokud testovací kapalina vytvoří kapičky či velkou kapku, má měřený povrch menší povrchové napětí než testovací kapalina a volíme kapalinu s nižším povrchovým napětím. Provádí se nejméně tři měření pro každou testovací kapalinu. Doporučená velikost měřené plochy je 10 x 10 cm. Testovací kapalina se nanáší štětečkem či kapátkem. Tato metoda slouží k nalezení přibližné hodnoty povrchového napětí. Jelikož se jedná o jedovaté látky, je nutné dodržovat příslušné laboratorní bezpečnostní opatření [102,103,116].

4.5.1.2 Kapková metoda

Jedna z nejčastěji používaných metod je založena na měření kontaktního úhlu mezi kapalinou a pevnou látkou. Zkouška se provádí nanesením kapaliny na povrch a změřením úhlu mezi kapkou a substrátem viz. **Obr. 13**. Je to velice vhodná metoda pro porovnání smáčivosti dvou nebo více substrátů a má dvě velké výhody. Vyžaduje jen velmi malé množství kapaliny a ovlivňuje pouze několik čtverečních milimetrů vzorku.

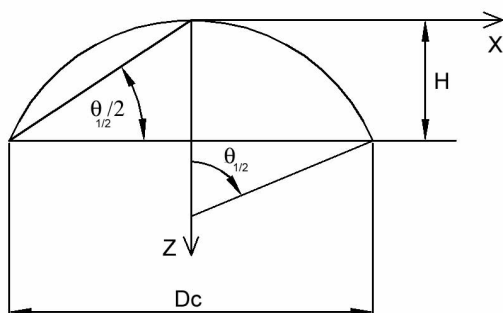


Obr. 13. Měření úhlu smáčení kapkovou metodou, podle [116]

Pro měření kontaktního úhlu byla vyvinuta řada metod [104-109]. Většina metod je založena na vytvoření obrazu kapky. Jedná se například o promítnutí kapky na stínítko nebo vytvoření digitálního obrazu. Vytvořený obraz je pak následně různými způsoby vyhodnocen.

Nejjednodušší vyhodnocovací metoda je založena na přiložení tangenty do kontaktního bodu a změření kontaktního úhlu pomocí úhloměru. Chyba vyplývající ze způsobu přiložení tangenty dosahuje až několika stupňů.

Další populární vyhodnocovací metoda je tzv. $\theta/2$ metoda [110]. Tato metoda je založena na předpokladu, že kapka je část kružnice. Kontaktní úhel je jednoduše vypočten podle následujícího **Obr. 14**.



Obr. 14. Schéma pro výpočet kontaktního úhlu pomocí $\theta/2$ metody [105].

Pro výpočet kontaktního úhlu stačí změřit pouze výšku kapky a průměr kontaktní kružnice. Tato metoda je poměrně přesná při použití dostatečně malé kapky, u které lze zanedbat vliv gravitační síly. Uvádí se, že optimální velikost kapky je 2 μl [111]. Při použití kapky s větším objemem nebo kapaliny s malou povrchovou energií se zvyšuje chyba této metody. Skutečný profil kapky odpovídá Young-Laplaceově rovnici [112-115]. Yang a kol. [105] vyvinuli metodu, která pomocí kapilární konstanty B (4.15) a objemu kapky umožňuje korekci kontaktního úhlu.

$$B = \frac{\Delta\rho \cdot g \cdot R_0^2}{\gamma} \quad (4.15)$$

kde $\Delta\rho$ je hustota kapaliny, g je gravitační zrychlení, R_0 poloměr vrcholu kapky a γ je povrchové napětí použité kapaliny. Hlavním problémem je zde určení R_0 . Z toho důvodu Young a kol. vypracovali nomogramy a tabulky [105] pro nalezení kapilární konstanty B v závislosti na objemu kapky a kontaktním úhlu změřeném metodou $\theta/2$.

Další způsoby vyhodnocení obrazu kapky jsou založeny na prokládání obrysu kapky matematickou funkcí. Jedna z těchto metod je založena na sejmutí souřadnic 3 – 5 bodů na obrysu kapky a jejich proložení polynomičkou funkcí [104]. Další metoda je založena na digitalizaci profilu kapky, určení jeho okrajových bodů a následné co nejvhodnější proložení křivkou získanou z Young-Laplaceovy rovnice [106].

Jiná metoda je založena na měření kontaktního úhlu laserovým paprskem. Kontaktní úhel je určován z difrakčního obrazce vytvořeného na stínítku úhlooměru při průchodu laserového paprsku rozhraním kapalina-pevná látka. [88,116]

4.6 Alergická reakce a typy alergií

Alergie je dnes již bohužel hojně rozšířené onemocnění imunitního systému. Setkáváme se s ní téměř na každém kroku. Přecitlivělost vychází z přehnané reakce imunitního systému na vnější podnět (antigen), který jiným jedincům neškodí, či dokonce prospívá. Imunitní systém má imunologickou paměť, do které se uloží všechny informace o novém antigenu (alergenu) a při příštím setkání se s nežádoucím antigenem rychleji vypořádá.

Alergická reakce je založena na reakci, kdy imunitní systém vytváří nadměrné množství protilátek. Alergen je pohlcen bílými krvinkami (makrofágy), ty ho rozloží na malé částičky a signalizují to dalším buňkám. Díky signálům začnou B-lymfocyty (imunitní látky) tvořit protilátky. Po prvním setkání s alergenem (antigenem) se protilátky, nazývané se imunoglobuliny E (IgE), dostávají krví do tkání, kde se zachycují na povrch žírných buněk (mastocytů). Jedna žírná buňka zachytí až 500 000 IgE protilátek. Nejvyšší koncentrace žírných buněk se nachází v nose, v průduškách, na kůži a v trávicím traktu. Zde IgE – buňky čekají na další setkání se stejným alergenem (antigenem), po kterém se aktivují žírné buňky. Uvnitř žírných buněk se nacházejí mediátory (chemické látky), např.: histamin, prostaglandiny, leukotrieny a kininy. Uvolněné mediátory přivolávají další buňky zánětu, tím se ještě více aktivují chemické látky (mediátory) a plně propukne alergická reakce v místě zánětu. Senzibilace je děj, při němž se organismus stává stále citlivějším na určitý podnět. Imunitní systém reagoval na styk s antigenem, uložil si tuto zkušenost do paměti a začal vytvářet proti němu specifické protilátky. Při opakovaném kontaktu tento antigen již rychle rozpozná a okamžitě na něj zareaguje. U každého člověka se doba, které je zapotřebí k tomu, aby citlivě nebo přecitlivěle reagoval, liší. U někoho stačí několik dnů, u jiného až několik let. Alergická reakce má dvě stadia aktivity: střední a pozdní. [119] Rozlišujeme pět typů alergií:

I. Typ přecitlivělosti, anafylaxe, atopie

Pojem „atopie“ je odvozen ze řečtiny a vztahuje se k tomu, že příznaky tohoto typu reakcí mohou být vzdáleny od místa, kde došlo ke kontaktu s antigenem. Reakce však může proběhnout i tam. Tato přecitlivělost je vyvolána především imunoglobuliny typu IgE a může jimi být přenesena i na další osobu. Tyto imunoglobuliny vyvolávají kaskádu reakcí, vedoucí k aktivaci mastocytů a vyplavení histaminu z jejich granulí do okolní tkáně. To vyvolá místní účinky, jako je kopřivka, otoky, rýma (nos), astma (průdušky) nebo průjem (střevo). Celkové

působení většího množství histaminu na organismus může vyvolat i šok (anafylaktický šok), vedoucí až ke smrti. [117]

II. Typ přecitlivělosti – cytotoxický

Při něm dochází k porušení membrán buněk, červených krvinek a krevních destiček, vede ke zničení těchto struktur.

III. Typ přecitlivělosti – imunokomplexový

Imunokomplexy vznikají normálně při reakci antigen-protilátka. Za normálních okolností jsou však rychle odstraňovány dalšími složkami imunitního systému. V případě chorobné reakce se neodstraní, kolují v krvi, pronikají do tkání a popř. se usazují v některých orgánech. V místě nakupení imunokomplexů se rozvíjejí další imunitní reakce, vedoucí k narušení až zničení postižených orgánů a tkání. [117]

IV. Typ přecitlivělosti pozdní, produkce lymfokininů

Uplatňuje se především v kůži a je vyvolána antigeny a hapteny (jde o látky, které samy o sobě nejsou antigeny, ale stanou se jimi po vazbě na velkou molekulu, např. některých bílkovin kůže; patří mezi ně i např. některá barviva užívaná v kosmetice nebo soli některých těžkých kovů – alergie na šperky). Ty jsou rozpoznány Langerhansovými buňkami v kůži a následuje aktivace T-lymfocytů proti kůži s obsahem antigenu nebo haptenu.

V. Typ přecitlivělosti – antireceptorová

Jde o imunitní reakci vůči receptorům (vazebným místům) na povrchu buněk. Její projevy jsou různé podle toho, jaké receptory jsou poškozovány. [117]

Nejvíce důležitá pro aplikace implantátů je alergická kontaktní reakce tedy Kontaktní přecitlivělost – typ IV. [118] Alergen neboli antigen, který je schopný vyvolat u přecitlivělého jedince alergickou reakci, nalezneme ovšem všude kolem sebe. Testy se provádějí v různých formách. Asi mezi nejznámější se řadí kožní testy. Ty mohou být také více možných aplikací:

- intrakutánní test – alergen se vpravuje do kůže přímo injekční stříkačkou, bolestivější, někdy vyvolá falešné pozitivní reakce;
- bodovací test („prick“) – alergen se na kůži nanese kapkou a rychle se propíchne suchou jehlou spolu s povrchovou vrstvou kůže, může přehlédnout slabé reakce;
- epikutánní náplastový test – alergen se nanese na kůži zad a nechá se působit. [119]

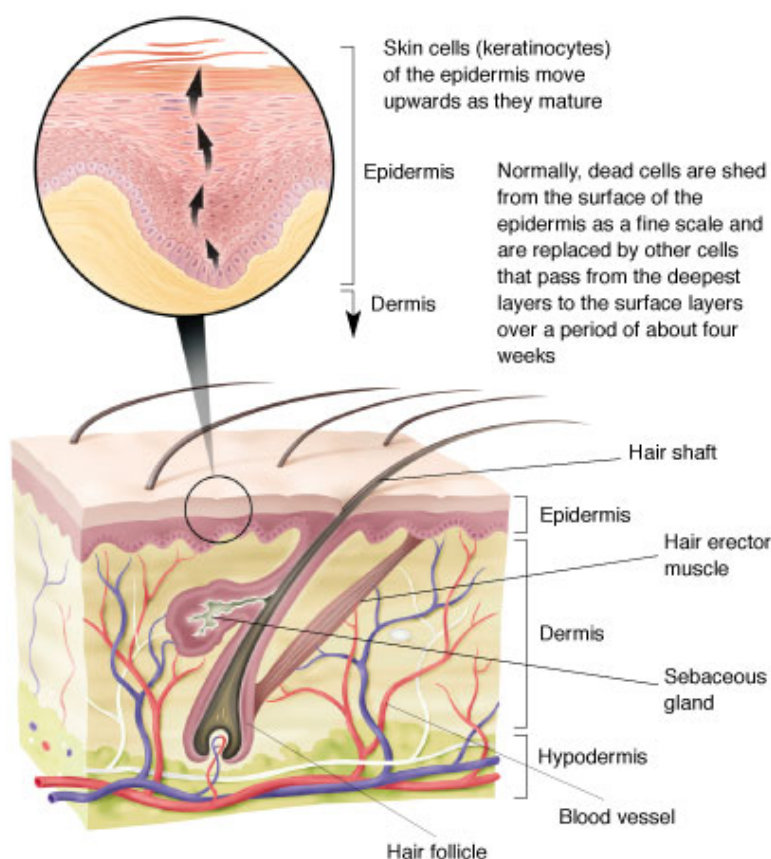
4.6.1. Struktura kůže

Kůže je složena ze tří hlavních vrstev:

První: pokožka (epidermis) cca 1 mm silná, tvořená z keratinocytů, melanocytů (pigment) a Langerhansových buněk. Spodní vrstva je zárodečná, z ní se tvoří nové vrstvy buněk. Ty se postupně dostávají na povrch, a tak mění během tří až čtyř týdnů starou pokožku na novou viz **Obr. 15**.

Druhá: škára (dermis) je 2,5 mm silná, protkána krevními a lymfatickými cévami, obsahuje množství nervových zakončení, mazových i potních žláz a také vlasových váčků. Toto "patro" obsahuje kolagenní a elastická vlákna, díky nimž je kůže trvanlivá, pružná a pevná.

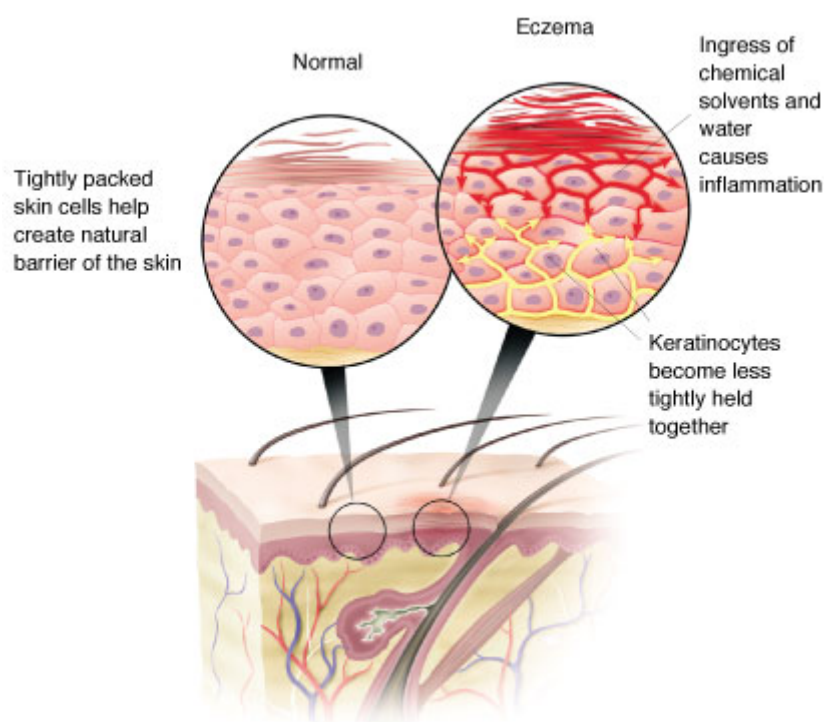
Třetí: podkožní vrstva (subkutánní) obsahuje tukové buňky a vazivová vlákna. Izoluje a chrání svaly, nervy a hlouběji uložené orgány.



Obr.15. Kůže je tvořena ze tří vrstev: epidermis, dermis a podkožní vrstvy obsahující tukové buňky. Přirozeně se odumřelé kožní buňky (keratinocyty) jemně uvolňují z povrchu epidermis a jsou nahrazeny dalšími buňkami z hlubších vrstev, perioda je cca čtyři týdny. [121]

4.6.2 Kontaktní alergická dermatitida

Kontaktní alergický ekzém je představitelem buňkami zprostředkované alergické reakce, na rozdíl od kontaktní iritační dermatitidy, která je vyvolána prostým drážděním kůže bez účasti pravé přecitlivělosti. Kontaktní alergický ekzém (viz. **Obr. 16.**) se projevuje po různé dlouhé době styku pokožky s alergenem a jeho vznik u konkrétního pacienta při opakovaném kontaktu s danou chemickou látkou nelze předem přesně odhadnout. Rozvoj tohoto onemocnění závisí zřejmě na interakci mezi individuální dispozicí jedince, zevním prostředím, které na pokožku působí, a konkrétními vlastnostmi vyvolávajícího faktoru. Metodou průkazu vyvolávající příčiny alergické reakce pozdního typu jsou epikutánní testy. V terapii se uplatňují zejména léčiva ze skupiny antihistaminik a lokálně aplikované kortikosteroidy, často se používají i různé lékové formy magistraliter přípravků (pozn. v lékárně připravených) s protizánětlivým účinkem. [120]

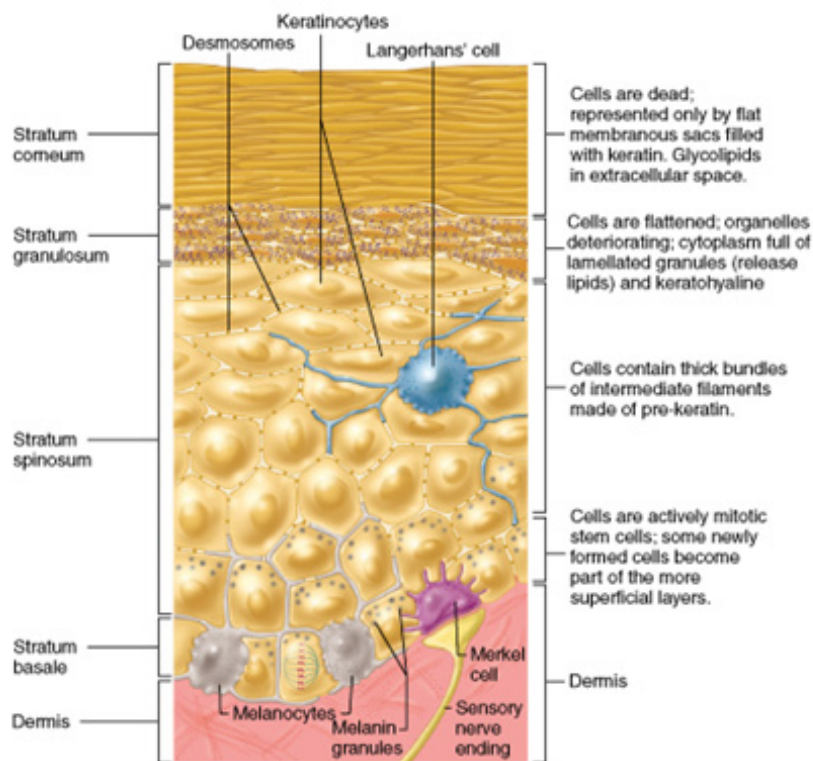


Obr.16. U normální pokožky tvoří těsně uspořádané kožní buňky přirozenou bariéru kůže. V případě ekzému spolu keratinocyty nedrží tak pevně a kůže se stává citlivá k externím vlivům jako jsou chemikálie a voda, které rozpouští přirozenou ochrannou bariéru kůže. [121]

4.6.3 Alergeny a navození senzibilizace

Kontaktní alergenys jsou téměř bez výjimky nízkomolekulární látky, které přicházejí do kontaktu s kůží ze zevního prostředí. Díky své malé velikosti snadno pronikají kožní bariérou, která je za normálních okolností pro velké molekuly relativně nepropustná, a dostávají se tak snadno do hlubších vrstev epidermis. K vyvolání kontaktní alergie musí být tyto nízkomolekulární látky prezentovány antigenprezentujícími buňkami, zejména epidermálními Langerhansovými buňkami viz **Obr.17.** nebo T lymfocyty. Efektorové buňky, které zprostředkovávají kontaktní alergii z přecitlivělosti, jsou klony těchto T lymfocytů. Aby došlo k interakci s antigenem prezentovaným Langerhansovými buňkami, jak při navození přecitlivělosti tak při vyvolání reakce, musí mít T lymfocyty na svém povrchu receptory komplementární k fyzikálně-chemickým vlastnostem antigenu.

Za normálních okolností mohou penetrovat rohovou vrstvou do hlubších vrstev epidermis pouze látky o malé molekulové hmotnosti (větší než 500 daltonů). Navodit a vyvolat kontaktní alergii mohou pouze antigeny o molekulární hmotnosti větší než 5000 daltonů.



Obr.17. Struktura kůže s vyobrazenými kožními buňkami [122]

Spojením látek o malé molekulové hmotnosti s autologními proteiny přítomnými v kůži vzniká antigen schopný vyvolat alergii.

T-lymfocyty nemohou reagovat s antigenem přímo i když mají odpovídající povrchové receptory. Antigen musí být nejdříve zpracován a potom prezentován ve vhodné formě na povrchu zúčastněných buněk, jako např. Langerhansovy buňky, které jsou nositeli imunitní odpovědi související s povrchovými antigeny, pro které mají T-lymfocyty specifické receptory. Tímto procesem je navozena senzibilizace.

Opakovaný styk se specifickým alergenem vyvolává řadu reakcí, které mohou vyústit v zánět charakteristický pro ekzematózní dermatitidu. Typickým histologickým obrazem je pak spongióza a přítomnost lymfocytů v epidermis, a infiltrát lymfocytů, histiocytů a kolísajícího počtu eosinofilů a basofilů v papilární dermis. Stejný histologický obraz je zjišťován i v biopsiích z míst, kde byl aplikován pozitivní epikutánní test. [123] [124]

5. Experiment I

V rámci prvního experimentu práce bylo provedeno testování uhlíkových vrstev vytvořených metodou MW/RF PACVD s cílem pro jejich medicínské užití v kostní chirurgii. Obsahem prvního projektu bylo studium dané problematiky, nalezení vztahů mezi podmínkami depozice, vlastnostmi vrstev a jejich biokompatibilitou. Vrstvy byly deponovány v Technické univerzitě v Lodži v Centru NANODIAM novou metodou MW/RF PACVD.

V experimentální části byla pro rozbor vlastností uhlíkových vrstev realizována následující měření:

- Měření kontaktního úhlu čtyřmi kapalinami
- Stanovení povrchové energie vrstev
- Sledování povrchu rastrovacím mikroskopem, opt. mikroskopií a opt. profilometrem
- Drsnost měřená optickým a dotykovým profilometrem
- Nanotvrdost měřená indentační metodou DSI indentorem Vickers a kontinuální metodou s indentorem Berkovich
- Scratch test
- Adheze a proliferace osteoblastů MG 63

5.1 Materiály a depozice

Pro studii byly použity vzorky z oceli AISI 316L tvaru malých disků o průměru 8mm a tloušťky 2,5mm. Chemické složení korozivzdorné oceli je uvedeno v **Tab.3**. Substráty byly obrobeny, elektrolyticky vyleštěny, ultrazvukově vyčištěny v acetonu a vysušeny.

Vzorky byly povlakovány uhlíkovou vrstvou v plasmovém reaktoru MW/RF PACVD (*Microwave and Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition*) viz. **Obr.18.A-B**. Parametry depozice byly optimalizovány pro vytvoření homogenní vrstvy na substrátu AISI 316L již v pracích Kaczorowského. [125,126]

V reaktoru byly vzorky ještě před samotným povlakováním čištěny v inertním argonovém plazmatu po dobu 10 minut. Při depozici vrstev se výkon MW generátoru pohyboval kolem 250 W a RF generátor měl výkon kolem 800 W. MW výkon byl generován skrz křemennou trubku umístěnou nvrchu reaktoru, naproti RF elektrodě (průměru 200mm). K elektrodě byl připojen radiofrekvenční generátor o frekvenci 13,56 MHz. Předpětí na elektrodě se pohybovalo dle procesu mezi 400 – 700 V.

Prekurzorem byl metan o průtoku 30 - 60sccm. Tlak v komoře se při depozicích pohyboval mezi 10 – 60 Pa. Vzorky byly umístěny 3cm pod vrškem komory na držáku, který byl postaven na elektrodě viz. **Obr.18.C**. Pro naši studii byly deponovány 4 uhlíkové vrstvy, každá při jiných parametrech procesu viz. **Tab.4**.

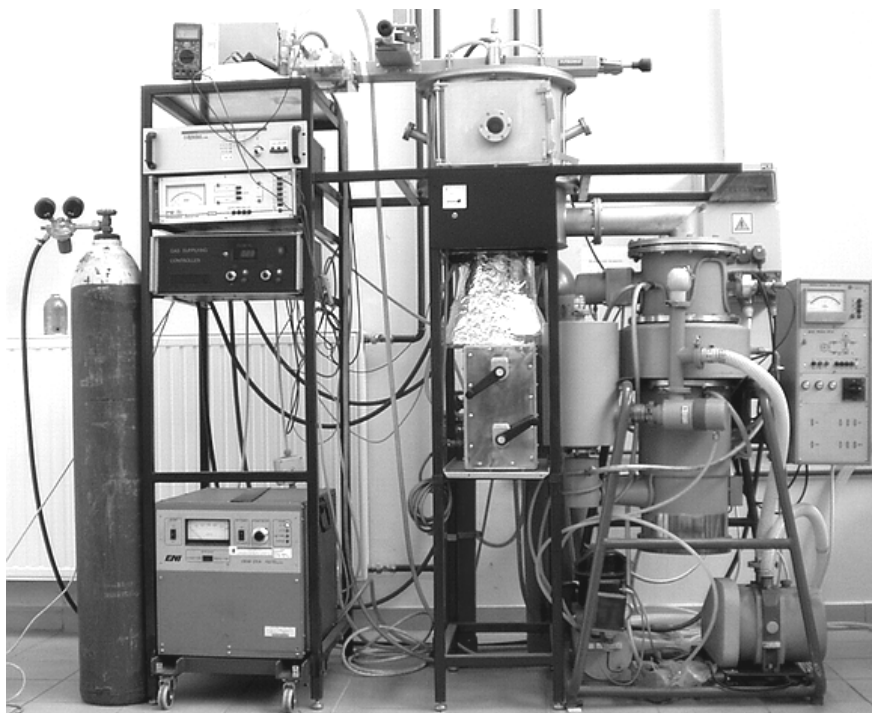
Tab. 3 Chemické složení použitého substrátu

| Chemické složení substrátu [%] | | | | | | | | |
|--|-------------|-------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-----------|----|
| ASTM - AISI 316L; UNI - X2CrNiMo1713.2; DIN (W. Nr.) 1.4404, ČSN PN 17 349 | | | | | | | | |
| C | Si | Mn | P | S | Cr | Ni | Mo | Ti |
| max. 0,03 | max. 1,0 | max. 2,0 | max. 0,045 | max. 0,030 | 16,5 - 18,5 | 11,0 – 14,0 | 2,0 – 2,5 | - |

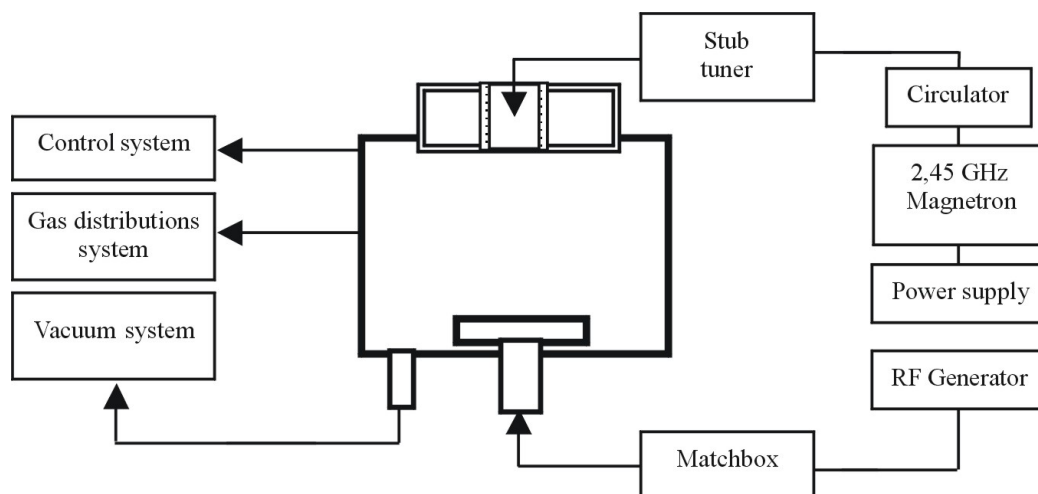
Tab. 4. Parametry depozičních procesů

| Proces (vrstva) | Metan [Sccm] | Předpětí V _B [V] | MW výkon [W] | Tlak [Pa] | Čas [min] |
|-----------------|--------------|-----------------------------|--------------|-----------|-----------|
| 1. | 30 | 400 | 250 | 10 - 30 | 6 |
| 2. | 60 | 500 | 250 | 10 - 60 | 3 |
| 3. | 40 | 600 | 250 | 10 - 40 | 4 |
| 4. | 30 | 700 | 250 | 10 - 30 | 5 |

A



B



C



Obr.18 (A) Fotografie a **(B)** schéma systému aparatury MW/RF PACVD; **(C)** vzorky byly při depozici umístěny na držáku položeném na elektrodě. [126]

5.2 Měření kontaktního úhlu a stanovení povrchové energie

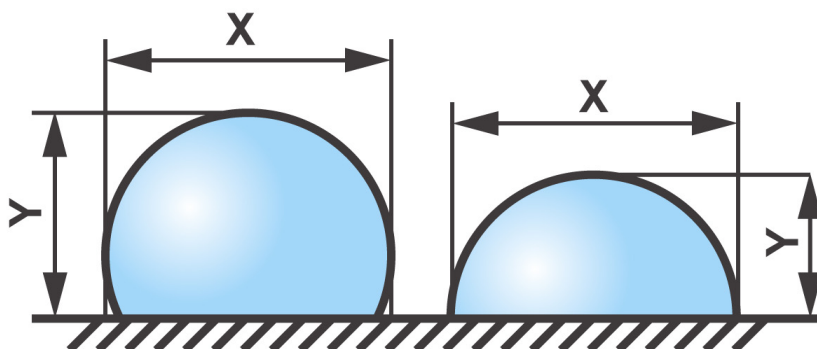
5.2.1 Princip a zařízení

Měření kontaktního úhlu je velmi citlivá metoda charakterizace povrchu pevných materiálů. Je to jedna z metod hodnocení hydrofility materiálu mezi kapalinou (např. destilovanou vodou) a pevnou látkou pomocí kapkové metody. Zkouška se provádí nanesením kapaliny na povrch substrátu a změřením kontaktního úhlu mezi kapalinou a povrchem materiálu.

Měření kontaktního úhlu bylo provedeno na zařízení zkonstruovaném v Laboratoři povrchových technologií na katedře materiálu Technické univerzity v Liberci. Zařízení se skládá ze speciálního stolku s mikroposuvem umožňujícím pohyb ve všech třech osách a natáčení okolo osy z. Ke stolku je nepohyblivě připevněna černobílá CCD kamera s rozlišením 640 x 480 pixelů. Kamera je vybavena objektivem s proměnlivým množstvím předsádek. Změna počtu předsádek umožňuje změnu zvětšení a hloubky ostrosti. Kamera je propojena přes PCI kartu s osobním počítačem a je tak zajištěno převedení snímaného obrazu do digitální podoby ve formátu bitmapy (.bmp). Zařízení je také možné použít pro dynamické snímání obrazu při studiu časové změny kontaktního úhlu.

Pro výpočet kontaktního úhlu byla použita metoda proložení kružnice. Vychází z předpokladu, že kapka je část kružnice. Aby byl tento předpoklad splněn co nejpřesněji, je použita kapka o velikosti 5 μ l. Je odečtena výška kapky a druhým používaným parametrem je maximální šířka kapky. Pro úhly větší než 90° je tento parametr roven průměru kapky viz.

Obr. 19. [116]



Obr.19. Odečítání výšky a šířky (průměru) kapky, podle [116]

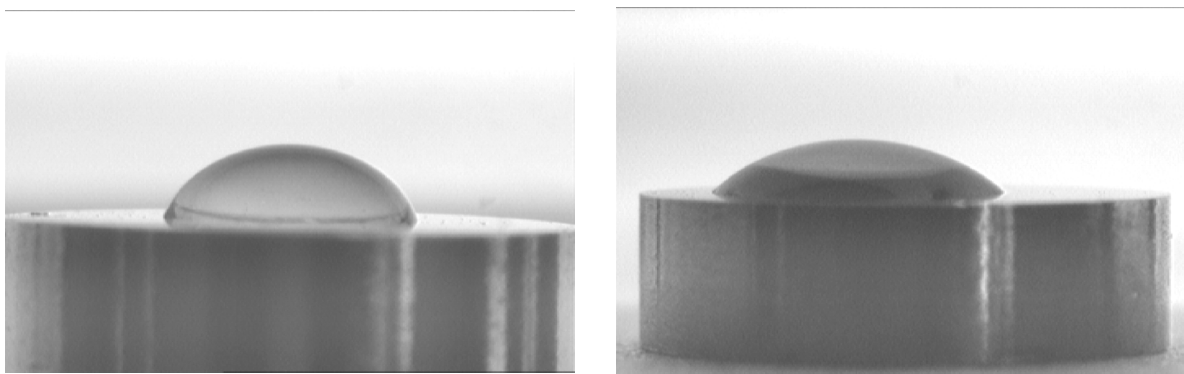
Výsledná hodnota kontaktního úhlu je vypočtena dle vztahu uvedeném na **Obr.20**. Do výpočtového vztahu jsou zařazeny rozhodovací podmínky, které na základě porovnání velikosti výšky y a šířky x vyhodnocují, zda bude kontaktní úhel větší, menší nebo roven 90° a podle toho je použit příslušný vztah.

$$\alpha := \begin{cases} 2 \cdot \arctan\left(2 \cdot \frac{y}{x}\right) & \text{if } \frac{x}{2} > y \\ \frac{\pi}{2} & \text{if } \frac{x}{2} = y \\ \left(\arcsin\left(\frac{2 \cdot y - x}{x}\right) + \frac{\pi}{2}\right) & \text{if } \frac{x}{2} < y \end{cases}$$

Obr.20. Vztah pro výpočet kont. úhlu, x – maximální šířka kapky, y – výška kapky [116].

Přednost této metody oproti $\theta/2$ metodě se projevuje při úhlech větších než 90° . Odpadá totiž problémová identifikace rozhraní kapka substrát. Vzhledem k možným odleskům od substrátu či omezené rozlišovací schopnosti použité kamery při větším zvětšení, není toto rozhraní vždy jednoznačně viditelné, na rozdíl od snadněji změřitelné šířky kapky, viz. **Obr.19**. [116]

Ukázka fotografií z měření kontaktního úhlu destilovanou vodou na vzorcích s vrstvou z prvního depozičního procesu a vrstvou z druhého depozičního procesu jsou na **Obr. 21**.

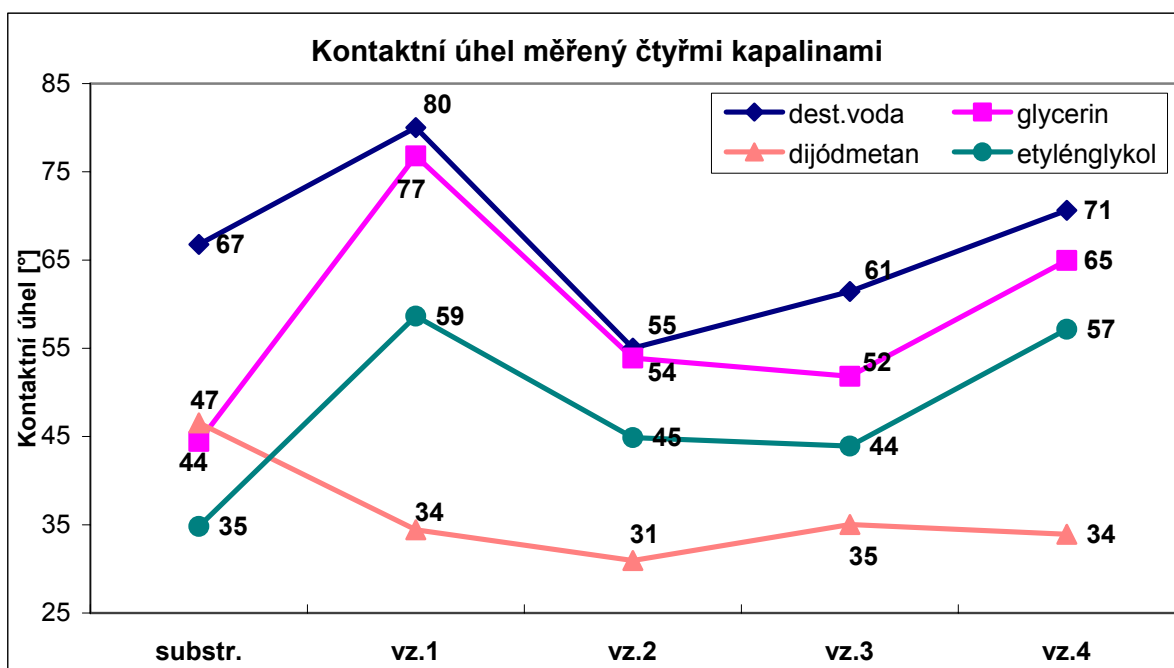


Obr.21. Měření kontaktního úhlu destilovanou vodou na substrátech s vrstvou 1 a 2.

5.2.2 Měření kontaktního úhlu

Pro měření kontaktního úhlu byla použita destilovaná voda, bezvodý glycerin, diiodmetan a etylenglykol. Povrchové napětí použitých kapalin je uvedeno v **Tab.5**. Pro vzorky bylo použito 5-7 kapek jednotlivé kapaliny. Výsledky měření kontaktního úhlu na substrátu a povlakovaných vzorcích vrstvami 1 až 4 a substrátu jsou uvedeny v **Tab.6** a na **Obr.22**.

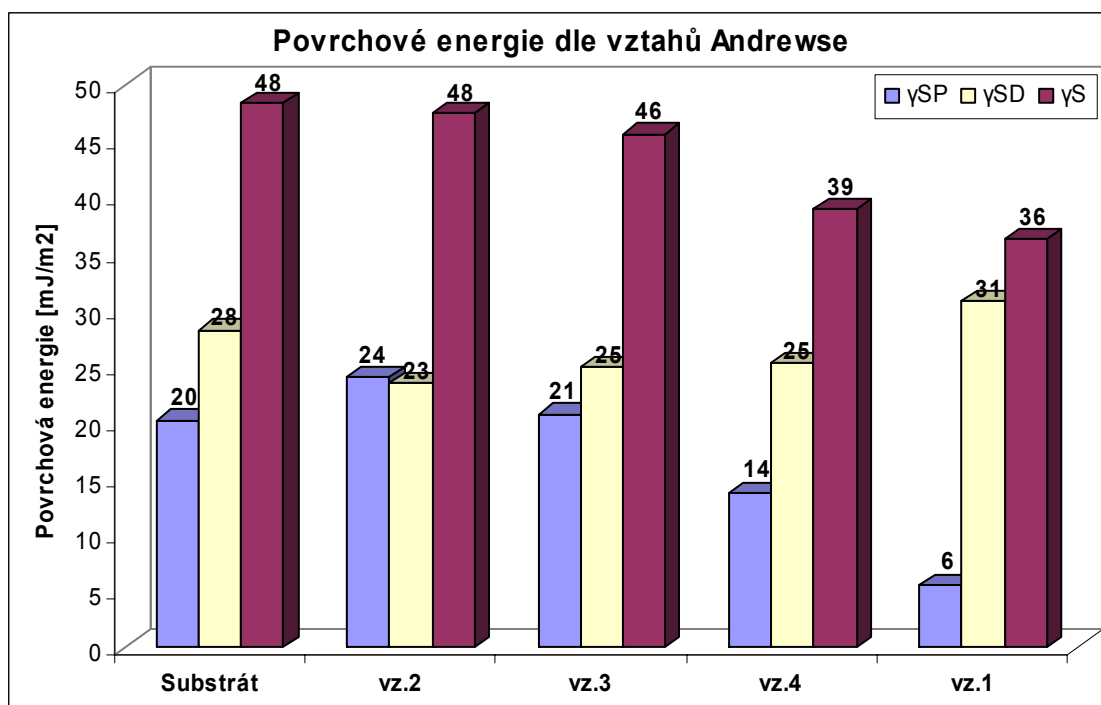
Naměřené hodnoty kontaktního úhlu pro destilovanou vodu jsou pro uhlíkové vrstvy jedna až čtyři: 80°, 55°, 61°, 71°, kontaktní úhel substrátu 67°. Přičemž kontaktní úhly měřené glycerinem pro jednotlivé vrstvy jsou 77°, 54°, 52°, 65° a etylenglykolem 59°, 45°, 44°, 57°. Měření kontaktního úhlu diiodmetan snižuje kontaktní úhel vrstev jedna až čtyři na přibližně stejné hodnoty 34°, 31°, 35°, 34°.



Obr.22. Hodnoty kontaktních úhlů pro jednotlivé vrstvy (vzorky) měřené destilovanou vodou, bezvodým glycerinem, diiodmetanem a etylenglykolem.

5.2.3 Stanovení povrchové energie dle vztahů Andrewse

Z naměřených kontaktních úhlů byla pomocí vztahů Andrewse a kol. (4.11) - (4.13), uvedených v kapitole 4.5, přibližně stanovena povrchová energie pro jednotlivé kombinace kapalin, které jsou uvedeny v **Tab. 5**. Průměrné hodnoty povrchové energie jsou uvedeny v **Tab. 6** a **Obr. 23**. Kalkulace povrchových energií výše popsanou metodou jsou přibližné, jelikož byl zanedbán vliv absorbovaných par do povrchu. Adsorbované páry snižují povrchovou energii a zvětšují tak kontaktní úhel. Dle početní metody má 1. vrstva nejnižší povrchovou energii 36 [mJ/m²], zároveň i nejmenší polární a nejvyšší disperzní složku povrchové energie ze všech sledovaných vrstev. U vrstev 2 - 4 se snižovala povrchová energie z 48 až na 39 [mJ/m²]. Přičemž jejich disperzní složky zůstávaly stejné, zato výrazněji se snížily jejich polární složky. Pokud přeřadíme hodnoty pro vrstvou 1 na konec grafu, tedy za vrstvu 4, získáme řadu snižující se povrchové energie, snižující se složky polární a mírně se zvyšující složky disperzní. Při porovnání s parametry procesu depozice vrstev viz. **Tab.4** by rozdíly mohl vysvětlit průtok metanu při procesu. Rozdíly tlaku mezi jednotlivými procesy v podstatě nejsou žádné. Výraznější vliv by mohl mít průtok metanu a odstupňované předpětí. Vrstva 4 i vrstva 1 mají stejný průtok metanu 30 sccm při procesu, avšak naprosto rozdílné předpětí na elektrodě 400V v případě první vrstvy oproti 700 V u čtvrté vrstvy. Přesto mají podobnou povrchovou energii. Pro malý počet sledov. procesů hlubší diskuse není možná.



Obr.23. Průměrné hodnoty povrchové energie pro jednotlivé vrstvy a substrát přibližně stanovené dle vztahů Andrewse a kol., hodnoty jsou zaokrouhleny.

Tab.5. Povrchové napětí použitých kapalin

| Povrchové napětí [mN/m] | | | |
|-------------------------|--------------|--------------|------------|
| Kapalina | γ_L^D | γ_L^P | γ_L |
| Destilovaná voda | 21,8 | 51 | 72,8 |
| Bezvodý glycerin | 33,6 | 29,7 | 63,3 |
| Dijódmetan | 49,5 | 1,3 | 50,8 |
| Etylénglykol | 30,9 | 16,8 | 47,7 |

Tab. 6. Hodnoty kontaktních úhlů měřené čtyřmi kapalinami a přibližné povrchové napětí spočtené pro kombinace kapalin

| Vzorek / vrstva | | Kontaktní úhel [°] | | | | Povrchová energie [mJ/m ²] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------|--------------------|----------|------------|--------------|--|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|--------|----------|--|
| | | dest.voda | glycerin | dijódmetan | etylénglykol | dest. voda x glycerin | | | dest.voda x dijódmetan | | | dijódmetan x glycerin | | | dest. voda x etylénglykol | | | etylénglykol x glycerin | | | etylénglykol x dijódmetan | | | Průměr | | |
| | | | | | | V _s ^P | V _s ^D | V _s | V _s ^P | V _s ^D | V _s | V _s ^P | V _s ^D | V _s | V _s ^P | V _s ^D | V _s | V _s ^P | V _s ^D | V _s | V _s ^P | V _s ^D | V _s | | | |
| S. | 67±1,4 | 44±2,9 | 47±0,6 | 35±1,2 | 6,1 | 50,0 | 56,0 | 12,2 | 30,3 | 42,5 | 18,2 | 29,0 | 47,1 | 14,7 | 24,8 | 39,5 | 60,9 | 4,2 | 65,1 | 9,1 | 31,2 | 40,3 | 20,2 | 28,2 | 48,4±9,3 | |
| 1. | 80±4,0 | 77±1,1 | 34±0,9 | 59±0,3 | 17,4 | 7,6 | 25,1 | 3,5 | 39,7 | 43,2 | 0,0 | 43,4 | 43,4 | 11,2 | 16,3 | 27,5 | 0,9 | 33,8 | 34,7 | 0,0 | 44,0 | 44,0 | 5,5 | 30,8 | 36,6±7,8 | |
| 2. | 55±5,8 | 54±2,7 | 31±3,3 | 45±2,1 | 37,3 | 8,6 | 45,9 | 16,5 | 36,5 | 53,1 | 6,4 | 39,6 | 46,0 | 38,9 | 7,4 | 46,4 | 44,0 | 5,9 | 49,9 | 1,2 | 42,6 | 43,8 | 24,0 | 23,5 | 47,5±3,1 | |
| 3. | 61±3,7 | 52±3,9 | 35±1,4 | 44±3,0 | 21,8 | 19,6 | 41,4 | 13,4 | 35,7 | 49,1 | 8,4 | 37,2 | 45,6 | 28,1 | 12,0 | 40,1 | 50,8 | 4,5 | 55,3 | 2,0 | 40,2 | 42,2 | 20,7 | 24,9 | 45,6±5,2 | |
| 4. | 71±4,2 | 65±1,7 | 34±1,2 | 57±0,9 | 19,0 | 13,5 | 32,5 | 7,4 | 38,0 | 45,4 | 2,2 | 40,5 | 42,7 | 21,9 | 10,1 | 32,0 | 31,6 | 6,2 | 37,8 | 0,0 | 43,5 | 43,5 | 13,7 | 25,3 | 39,0±5,3 | |

5.2.4 Stanovení povrchové energie Kaelbleho grafickou metodou

Podle literatury je možné rozlišit složky povrchové energie. Kaelble navrhl rozdělení polárních a disperzních složek. Pro adhezní práci můžeme potom vyjádřit vztah

$$w_{SL} = \gamma_L \cdot (1 + \cos \theta) = 2 \cdot \sqrt{(\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d)} + 2 \cdot \sqrt{(\gamma_S^p \cdot \gamma_L^p)} \quad (5.1)$$

Dělíme-li krajní členy rovnice výrazem $2 \cdot \sqrt{(\gamma_L^d)}$ je získána rovnice přímky

$$\frac{w_{SL}}{2 \cdot \sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_S^p} \cdot \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_S^d} \quad (5.2)$$

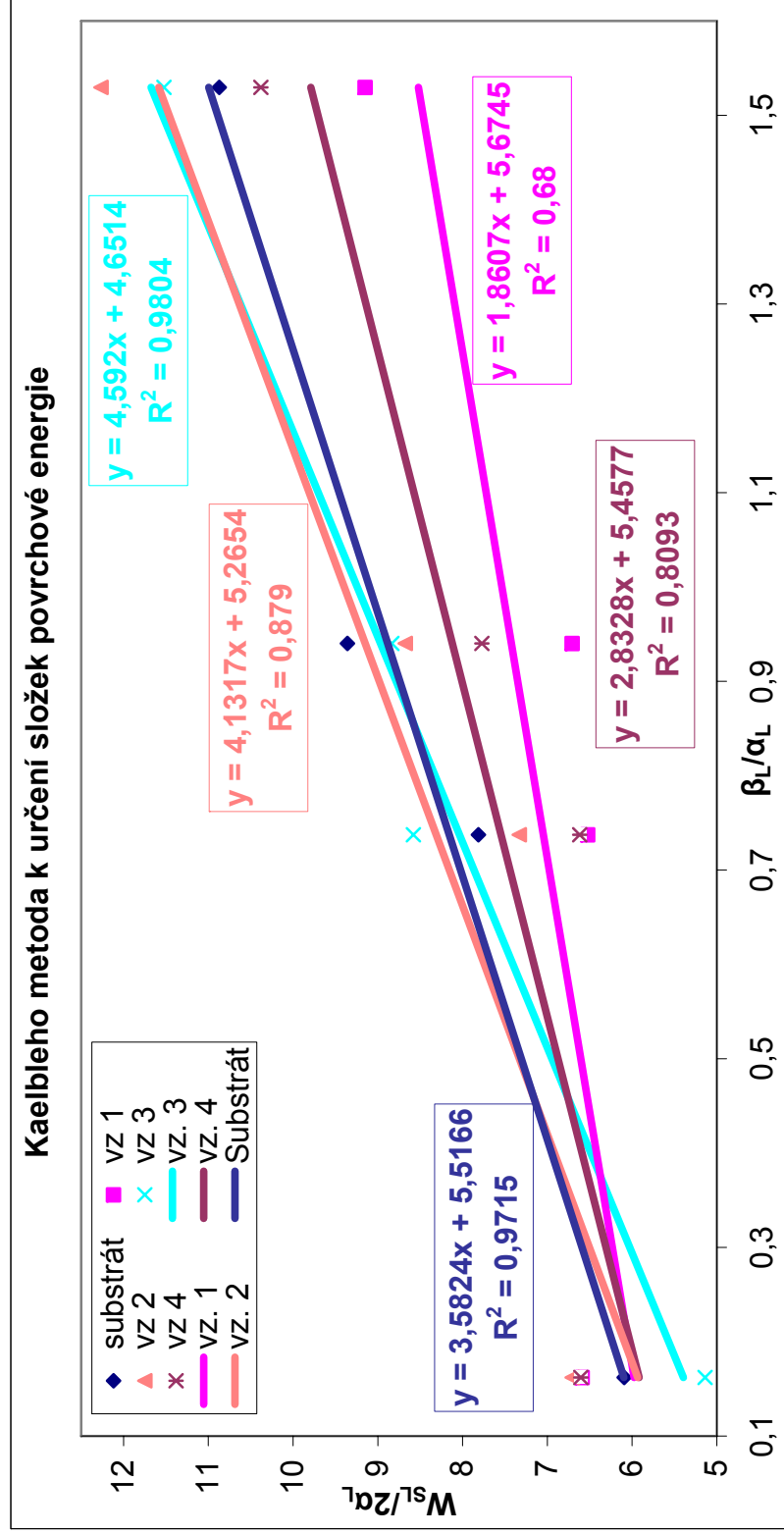
Z grafického vyjádření potom směrnice přímky udává $\sqrt{(\gamma_S^p)}$ a úsek na ose y $\sqrt{(\gamma_S^d)}$. Pro zjednodušení jsou nahrazeny odmocniny složek povrchové energie vyjádřením $\alpha = \sqrt{(\gamma_L^d)}$ a $\beta = \sqrt{(\gamma_L^p)}$. Na základě vypočtených hodnot kosinu úhlu smáčení θ , je možné provést odhad složek povrchové energie vrstev odvozené vztahem (5.2) podle Kaelbleho teorie. [127]

Pomocí Kaelbleho grafu byl proveden odhad disperzní a polární složky povrchové energie pro substrát a vrstvy 1 až 4. Hodnoty pro výpočet pomocí této metody jsou uvedeny v **Tab. 7**. Souhrnný Kaelbleho graf pro všechny vrstvy 1-4 a substrát je vyobrazen na **Obr.23**, grafy pro jednotlivé vrstvy a substrát jsou uvedeny v **Obr.24 A-E**. V grafech byla jako spojnice trendu použita lineární regrese, ze směrnice rovnic byly přepočítány polární a z úseku na ose y disperzní složky povrchových energií. Odečtené hodnoty z Kaelblova grafu a povrchové energie jsou uvedeny v **Tab. 8** a **Obr.25**.

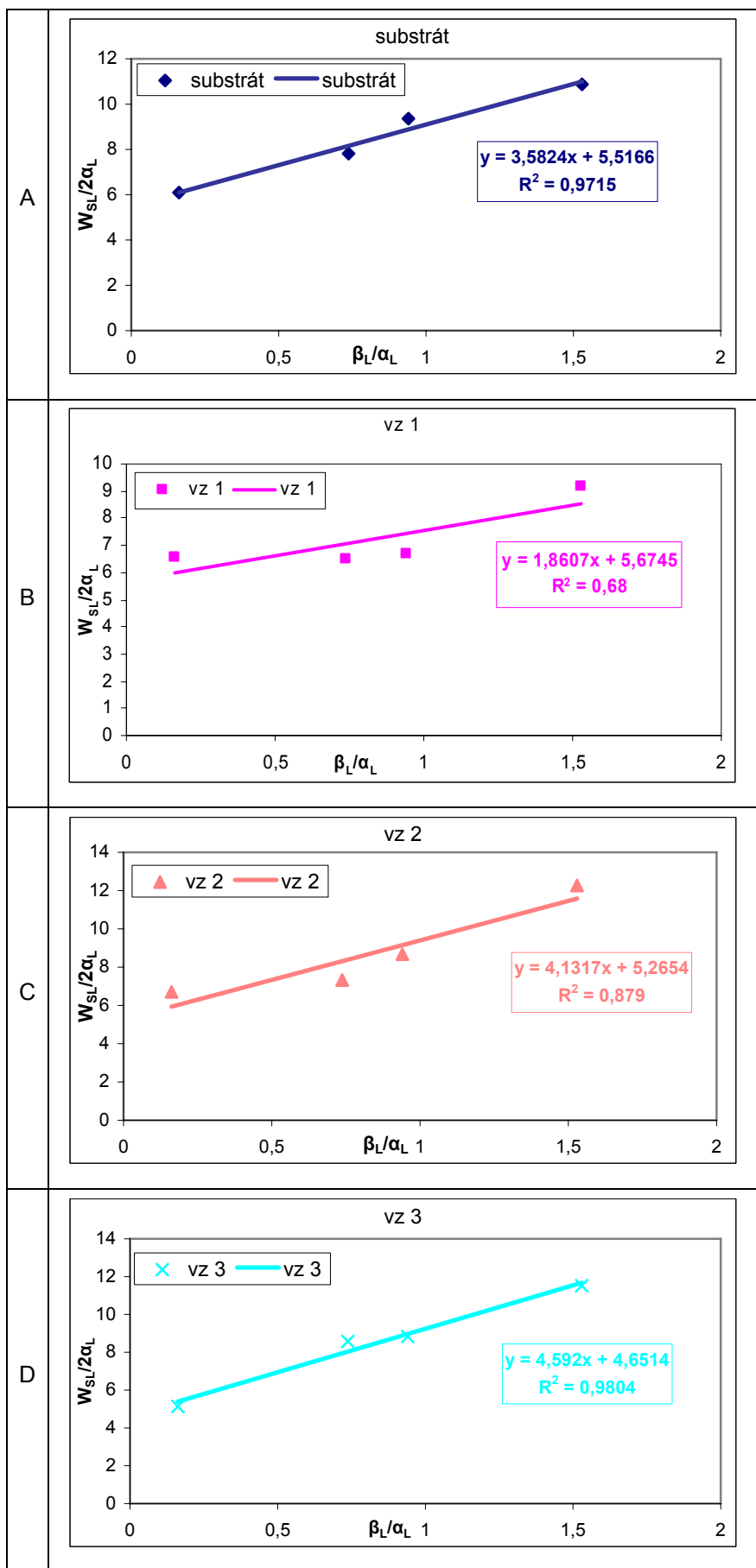
Hodnoty povrchové energie v porovnání s předchozí metodou se u Kaelbleho grafické metody snížily, naopak se zvýšily rozdíly mezi disperzní a polární složkou u jednotlivých vzorků. Nejnížší povrchovou energii vykazuje opět první vrstva 36 [mJ/m²], která má i nejnižší polární složku 3 [mJ/m²] a nejvyšší disperzní složku 32 [mJ/m²]. Vrstva čtyři vykazuje podobné hodnoty povrchové energie 38 [mJ/m²] a složek jako první vrstva. Nejvyšší hodnoty povrchové energie dosahuje druhá vrstva 45 [mJ/m²]. Substrát má stejnou povrchovou energii jako druhá vrstva, ale její disperzní a polární složky jsou stejné na rozdíl od složek povrchové energie u substrátu.

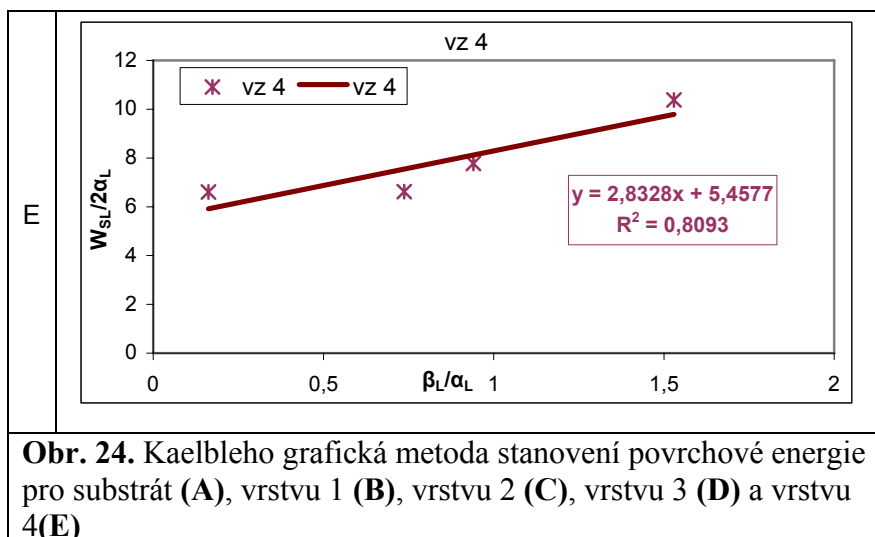
Tab. 7. Hodnoty pro výpočet pomocí Kaelblovy grafické metody

| Povrchové napětí [mN/m] | | | | substrát | | | vz 1 | | | vz 2 | | | vz 3 | | | vz 4 | | |
|-------------------------|--------------|--------------|------------|-------------|--------------------|--------------|----------|--------------------|--------------|----------|--------------------|--------------|----------|--------------------|--------------|----------|--------------------|------|
| Kapalina | γ_L^D | γ_L^P | γ_L | $2\alpha_L$ | β_L/α_L | $\cos\theta$ | W_{SL} | $W_{SL}/2\alpha_L$ | $\cos\theta$ | W_{SL} | $W_{SL}/2\alpha_L$ | $\cos\theta$ | W_{SL} | $W_{SL}/2\alpha_L$ | $\cos\theta$ | W_{SL} | $W_{SL}/2\alpha_L$ | |
| Voda | 21,8 | 51 | 72,8 | 9,34 | 1,53 | 0,39 | 101,52 | 10,87 | 0,17 | 85,43 | 9,15 | 0,57 | 114,54 | 12,27 | 0,48 | 107,60 | 11,52 | 0,33 |
| Glycerin | 33,6 | 29,7 | 63,3 | 11,59 | 0,94 | 0,71 | 108,50 | 9,36 | 0,23 | 77,75 | 6,71 | 0,59 | 100,60 | 8,68 | 0,62 | 102,42 | 8,83 | 0,42 |
| Dijodm. | 49,5 | 1,3 | 50,8 | 14,07 | 0,16 | 0,69 | 85,73 | 6,09 | 0,82 | 92,70 | 6,59 | 0,86 | 94,37 | 6,71 | 0,42 | 72,31 | 5,14 | 0,83 |
| Etyléng. | 30,9 | 16,8 | 47,7 | 11,12 | 0,74 | 0,82 | 86,86 | 7,81 | 0,52 | 72,52 | 6,52 | 0,71 | 81,50 | 7,33 | 1,00 | 95,40 | 8,58 | 0,54 |



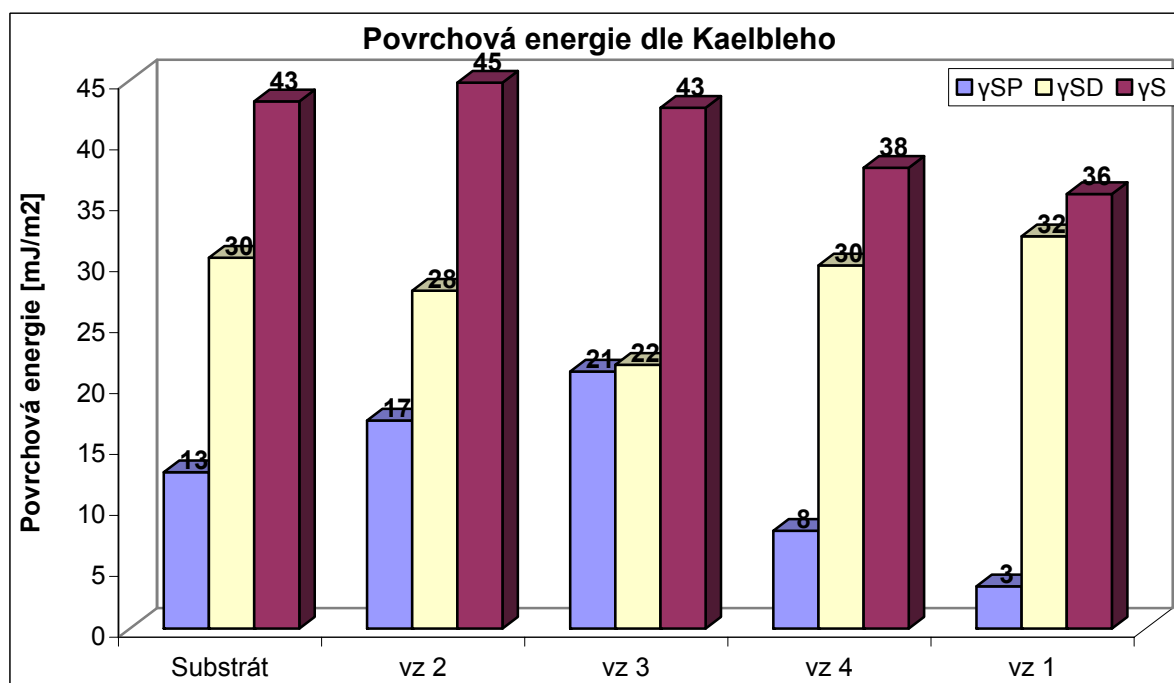
Obr. 23. Kaelbleho grafická metoda k určení složek povrchové energie pro vrstvy 1 až 4 a substrátu.





Tab. 8. Hodnoty odečtené z Kaelbleho grafu

| Data odečtená z Kaelbleho grafu | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|------------|
| Vzorek | Spojnice trendu - rovnice regrese | Hodnota spolehlivosti | γ_s^D | γ_s^P | γ_s |
| Substrát | $y = 3,5824x + 5,5166$ | $R^2 = 0,9715$ | 30,43 | 12,83 | 43,26 |
| vz 1 | $y = 1,8607x + 5,6745$ | $R^2 = 0,68$ | 32,19 | 3,46 | 35,65 |
| vz 2 | $y = 4,1317x + 5,2654$ | $R^2 = 0,879$ | 27,72 | 17,07 | 44,79 |
| vz 3 | $y = 4,592x + 4,6514$ | $R^2 = 0,9804$ | 21,64 | 21,09 | 42,73 |
| vz 4 | $y = 2,8328x + 5,4577$ | $R^2 = 0,8093$ | 29,79 | 8,02 | 37,81 |



Obr.25. Hodnoty povrchové energie pro jednotlivé vrstvy přibližně stanovené dle grafické Kaelbleho metody, hodnoty jsou zaokrouhleny na celá čísla.

5.2.5 Povrchové napětí stanovené pomocí tinktur

Pomocí tinktur odstupňované sady Arcotec Testtinte (18-105 mN/m) firmy Arcotec Oberflächentechnik GmbH, lze jednoduše a rychle stanovit povrchové napětí testovaného povrchu. Testovací kapaliny mají přesně definované hodnoty kritického povrchového napětí, které se docílí určitým smícháním kapalin, jako jsou Ethylenglycol-monoethylether (Cellosolve), Formamid, Metanol a voda. Způsob měření tinkturami je definován normou DIN 53 364. Na měřený povrch se nanese testovací kapalina o určité hodnotě povrchového napětí v podobě tenkého filmu. Pokud se tento film do 2 sekund po nanesení dále rozlije, má měřený povrch větší povrchové napětí než testovací kapalina. Volíme kapalinu s vyšší hodnotou povrchového napětí a test opakujeme. Pokud testovací kapalina vytvoří kapičky či velkou kapku, má měřený povrch menší povrchové napětí než testovací kapalina a volíme kapalinu s nižším povrchovým napětím. [116] Tinkтуры byly nanášeny na vzorky a dle smáčivosti či nesmáčivosti k povrchu vzorků přiřazeny hodnoty povrchového napětí. Vzhledem k malé velikosti vzorků a tedy nemožnosti dodržet přesný návod (doporučená velikost plochy 10 x 10cm!) na použití těchto tinktur, jsou výsledné hodnoty v **Tab.9.** velmi orientační a spíše jen pro zajímavost.

Tab.9. Povrchové napětí vrstev a substrátu stanovené tinkturami

| Povrchové napětí dle sady Arcotec [mN/m] | Substrát | Vrstva 1 | Vrstva 2 | Vrstva 3 | Vrstva 4 |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 35 | 32-35 | 35-38 | 38 | 35-38 |

5.3 Mikrostruktura a topografie vrstev

5.3.1 Optická mikroskopie

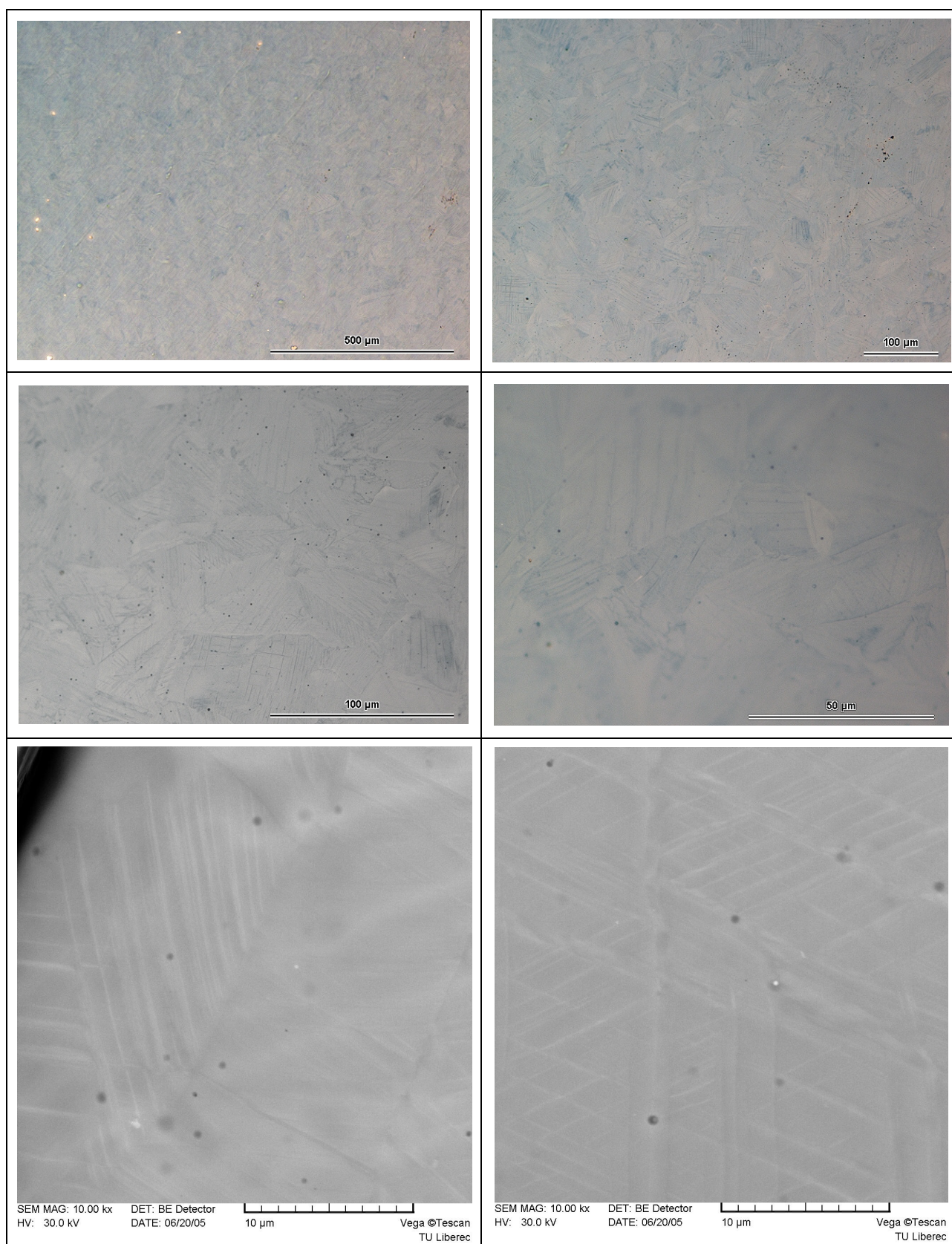
Fotografie povrchu povlakovaných vzorků byly pořízeny mikroskopem Nikon EPIPHOT 200 při zvětšení 100x, 200x, 500x a 1000x a zpracovány v programu LUCIA G na katedře materiálu TUL.

Sledované uhlíkové vrstvy **Obr.26-29.** mají specifickou topografii, vykazují řádově až stomikronové oblasti, které mají stejnou směrovou strukturu. Tyto orientované oblasti jsou k sobě navzájem odlišně natočené a vytváří tak povrch s různorodou přesto však pravidelnou strukturou. Struktura povrchu vrstev je nejméně patrná u vrstev 1 a 3 avšak velmi dobře vystupuje a je sledovatelná u vrstev 2 a 4. Právě vrstvy 3 a 1 vykazovaly nejlepší adhezi osteoblastů sedmý den po nasazení, přičemž na fotografiích působí velmi hladce oproti vrstvám 2 a 4. Zdá se, že popsaná orientovaná struktura povrchu vrstev, může být alespoň v prvních dnech i překážkou v adhezi a proliferaci buněk.

5.3.2 SEM analýza

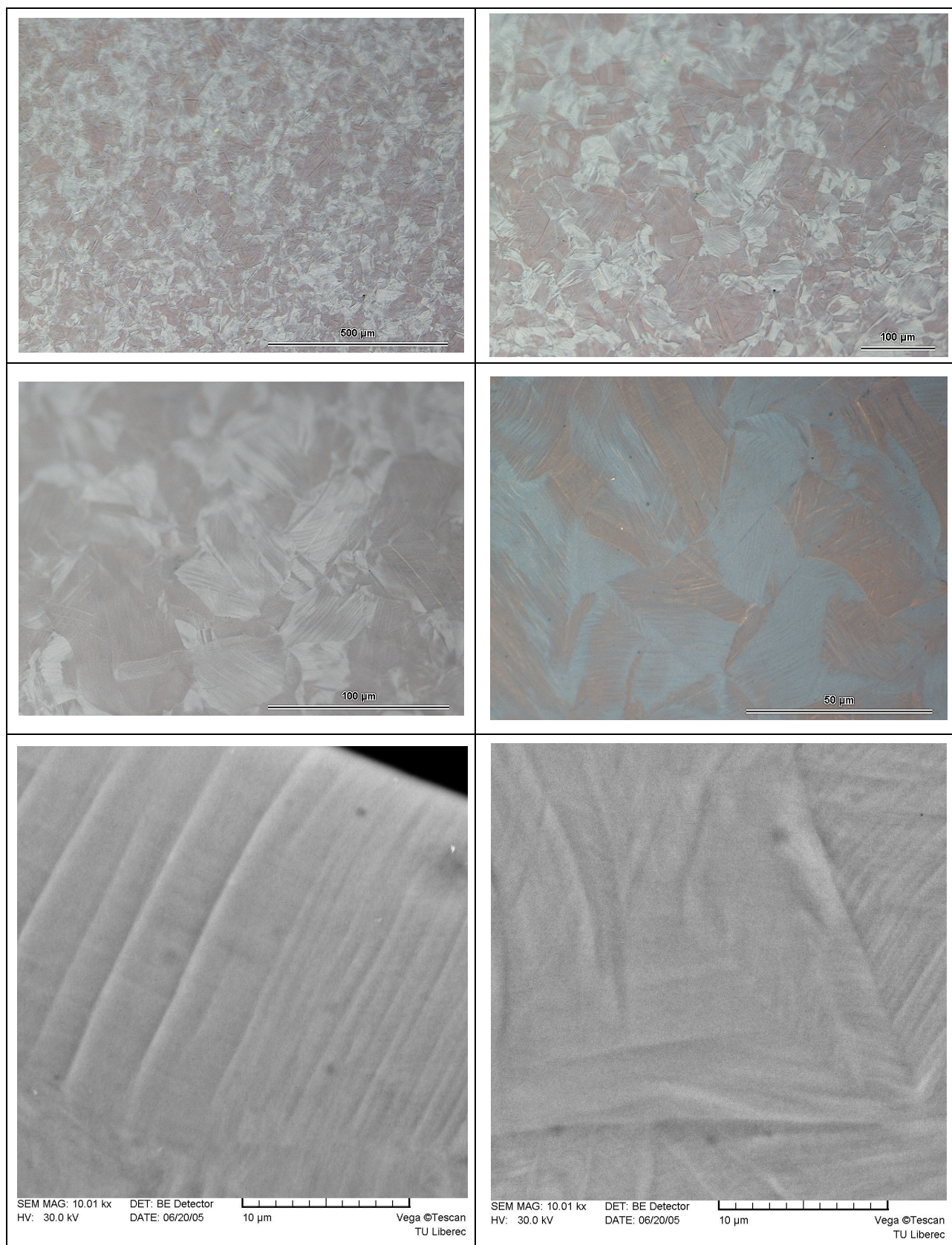
Dále bylo provedeno sledování povrchu vzorků (viz. **Obr.26-29.** dole) na rastrovacím elektronovém mikroskopu typu VEGA TS 5130, které doplňuje optickou mikroskopií. Vzorek 3 vykazoval větší pórovitost ve srovnání s ostatními vzorky, vzorky s vrstvami 2 a 4 měly větší rozdíly ve struktuře povrchu na okrajích a ve středech vzorků. Odlišná morfologie vrstev či topografie povrchu může být jedním z důvodů preference růstu buněk na krajích vzorků, která byla sledována první i třetí den po nasazení buněk.

Vrstva 1



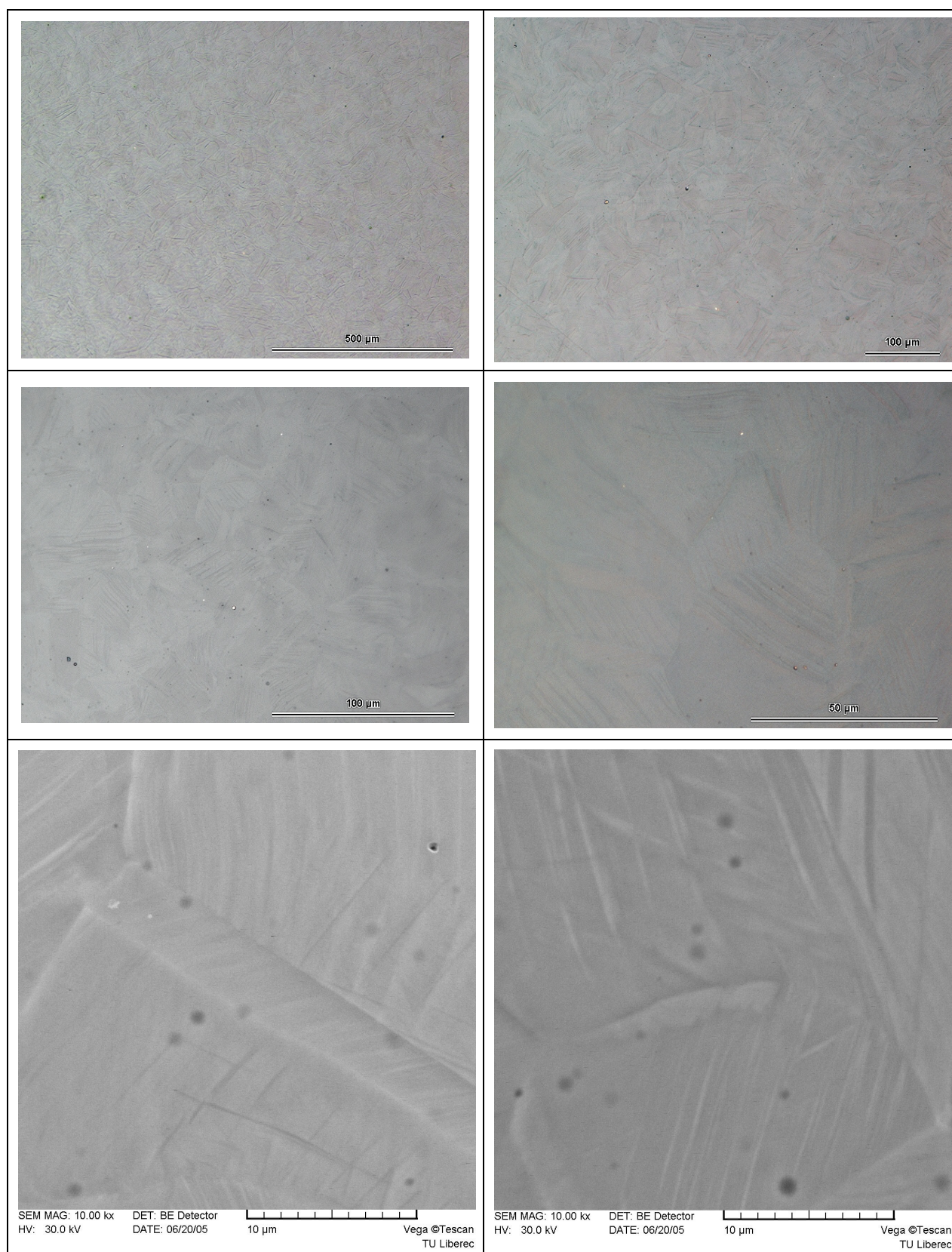
Obr.26. Fotografie z optického a rastrovacího mikroskopu vrstvy 1

Vrstva 2



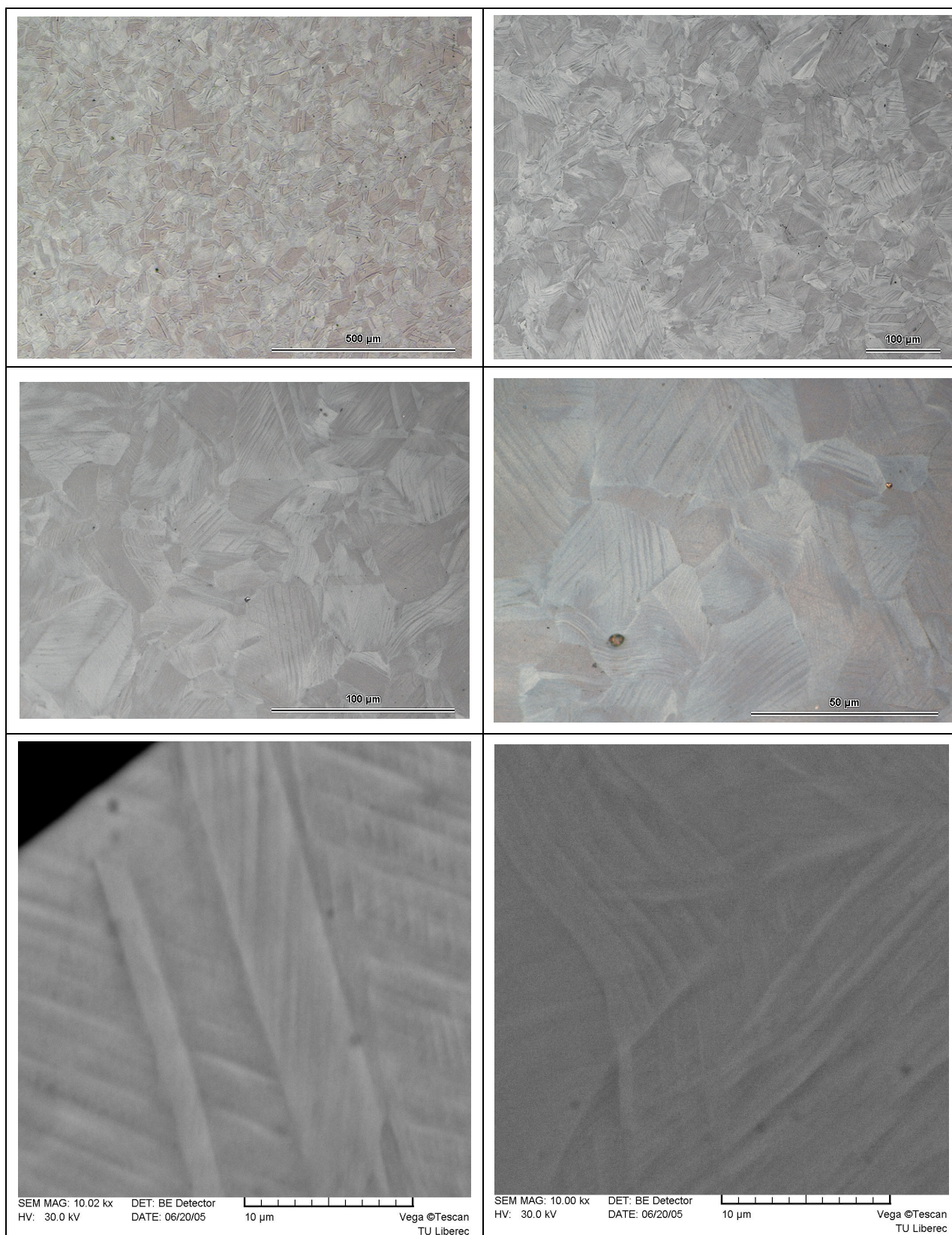
Obr.27. Fotografie z optického a rastrovacího mikroskopu vrstvy 2

Vrstva 3



Obr.28. Fotografie z optického a rastrovacího mikroskopu vrstvy 3

Vrstva 4



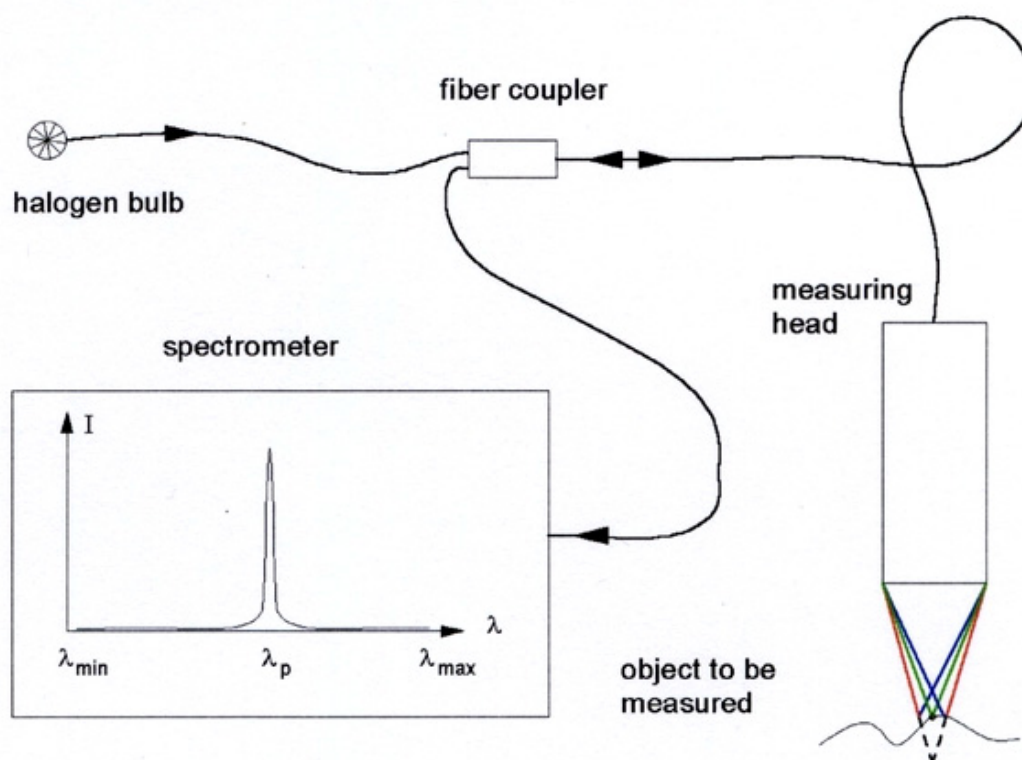
Obr.29. Fotografie z optického a rastrovacího mikroskopu vrstvy 4

5.3.3 Analýza vrstev optickým profilometrem

Pomocí optického profilometru byla provedena analýza povrchu vzorků s uhlíkovými vrstvami nepovlakovaného substrátu. Analýza drsnosti a topografie povrchu byla provedena pomocí programu Acquire a FRT Mark III V3.8.10 na přístroji od společnosti FRT FRIES RESEARCH & TECHNOLOGY GmbH na katedře materiálu v centru NANOPIN.

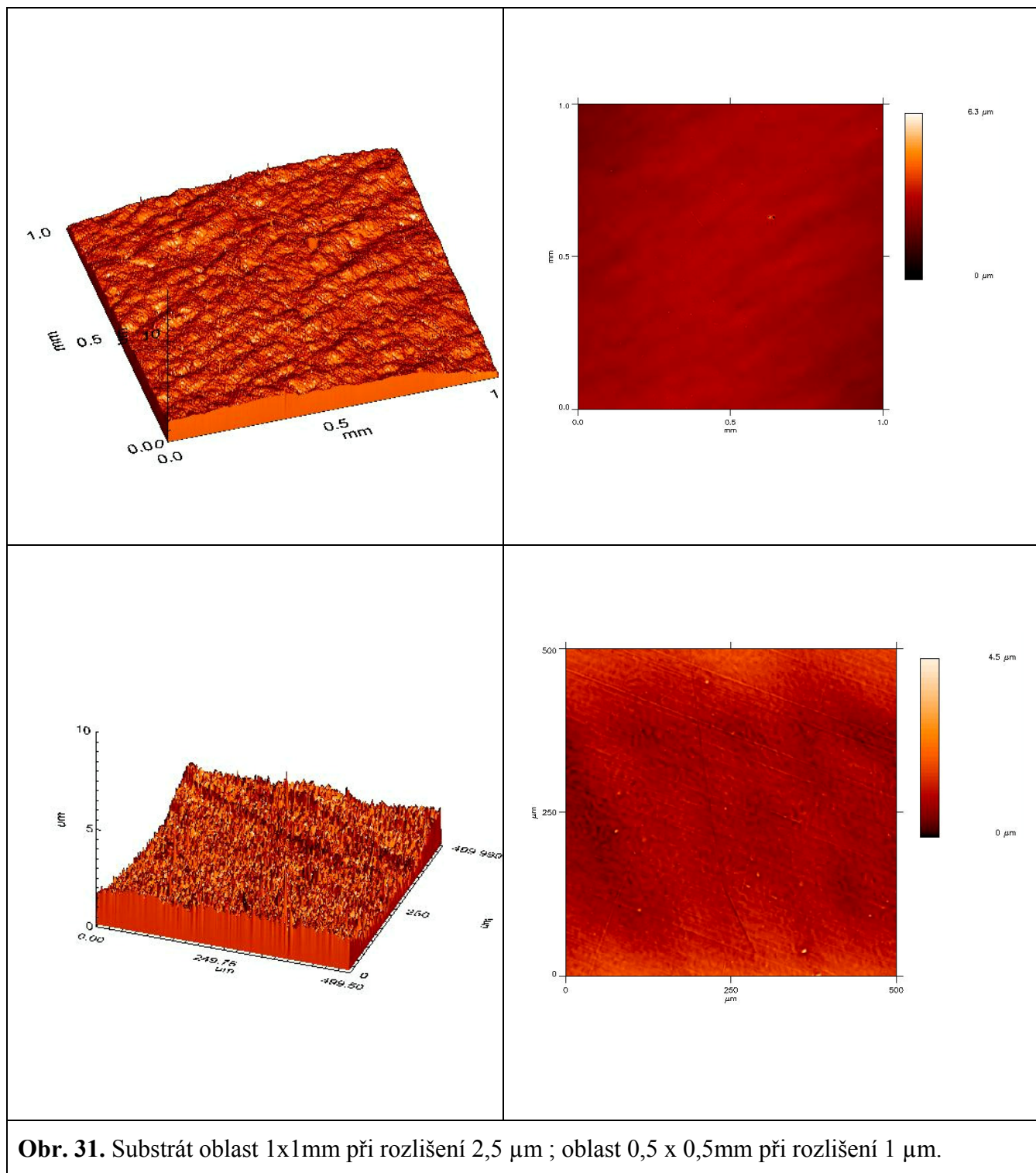
Pro měření drsnosti a zobrazení struktury povrchu byly vybrány oblasti uprostřed vzorků o velikostech 1 x 1 mm (rozlišení 2,5 μ m) a 0,5 x 0,5 mm (rozlišení 1 μ m) viz. **Obr.31 – 35**. Hodnoty drsnosti vzorků a substrátu jsou uvedeny v **Tab. 10** pro dvě celkové délky 0,125 mm a 0,250 mm.

Měření topografická, profilová nebo povrchové drsnosti se provádějí v režimu konfokálního měření vzdálenosti (FRT CWL). Bílé světlo je zaměřeno skrz optiku s výraznou chromatickou aberací na povrch měřeného objektu. Reflektované světlo dosahuje maxima vlnové délky pro fokusovaný povrch. Spektrum reflektovaného světla ukazuje výrazný pík. Spektrální pozice tohoto píku určuje vzdálenost k povrchu viz. **Obr.30**. [128]



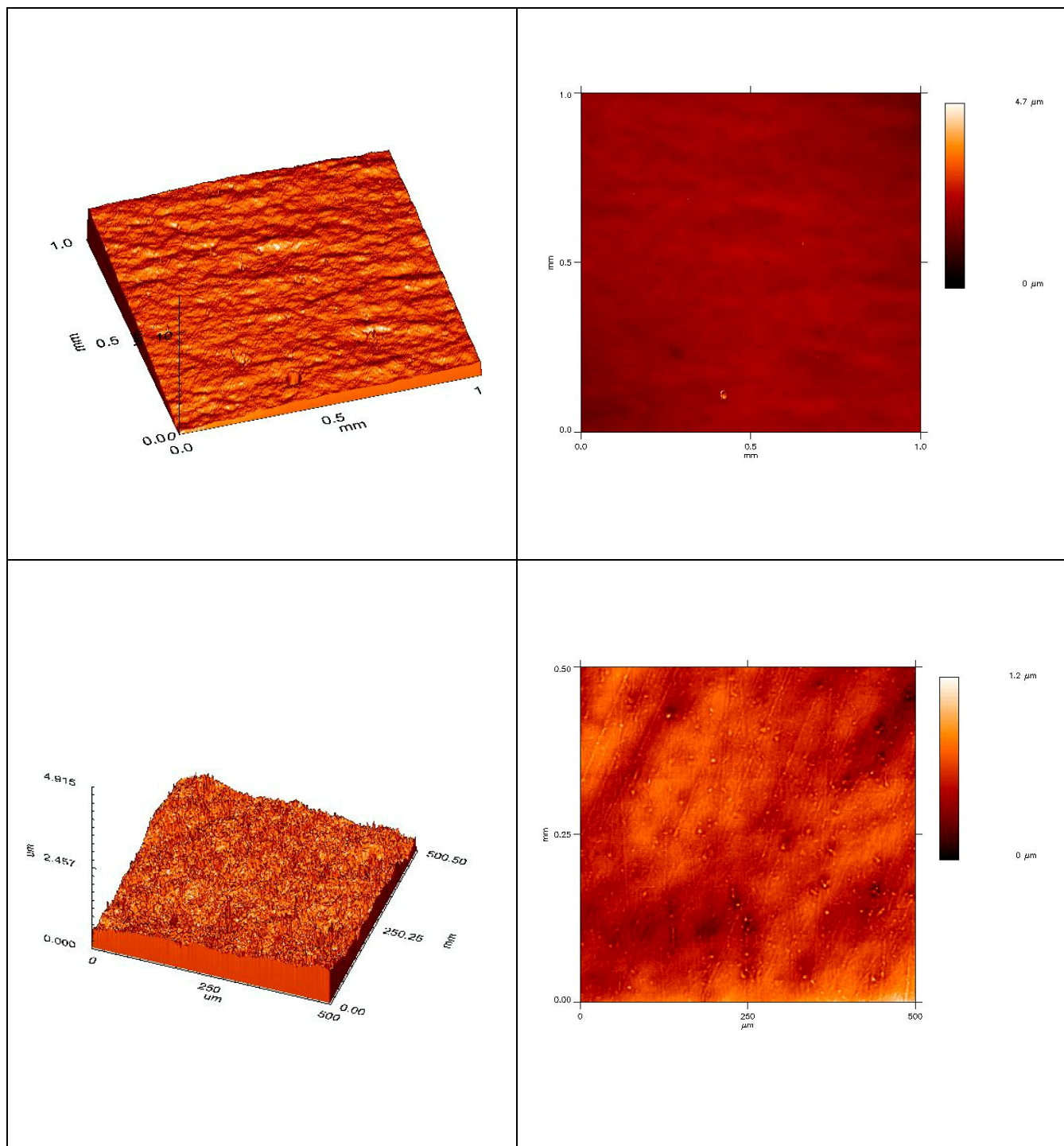
Obr. 30. Princip konfokálního měření [128]

Substrát



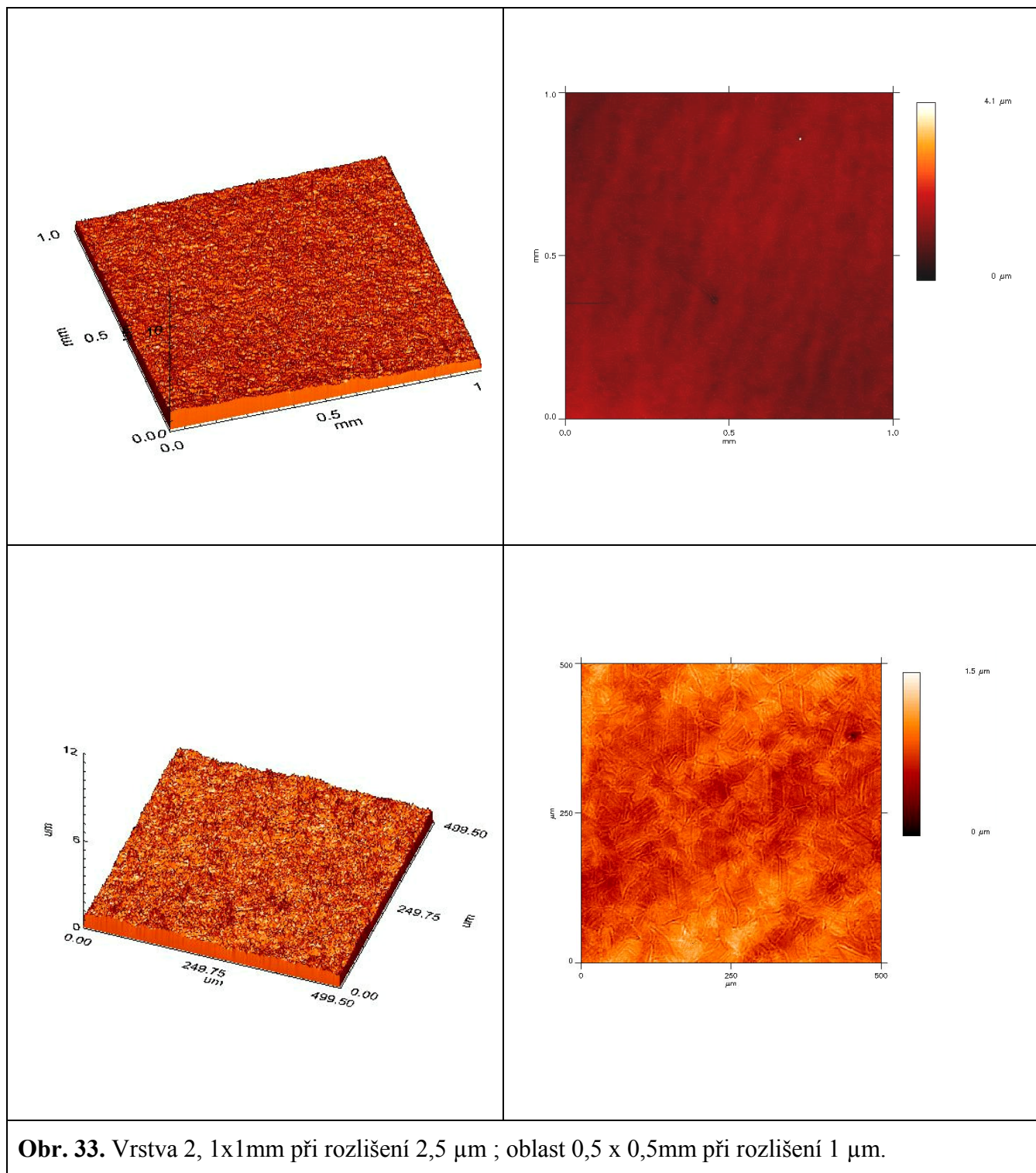
Obr. 31. Substrát oblast 1x1mm při rozlišení 2,5 μm ; oblast 0,5 x 0,5mm při rozlišení 1 μm.

Vrstva 1



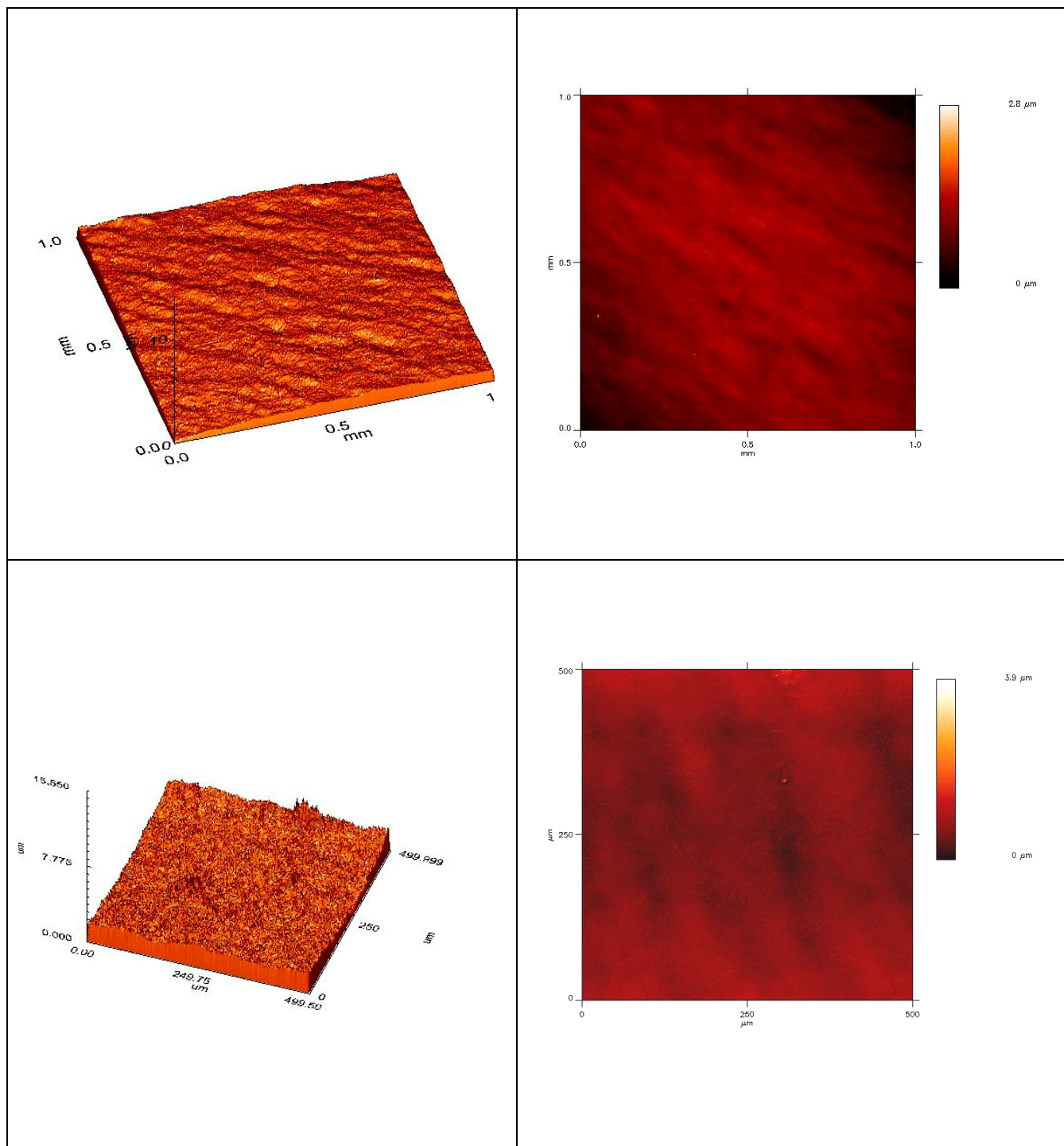
Obr. 32. Vrstva1, 1x1mm při rozlišení 2,5 μm ; oblast 0,5 x 0,5mm při rozlišení 1 μm.

Vrstva 2



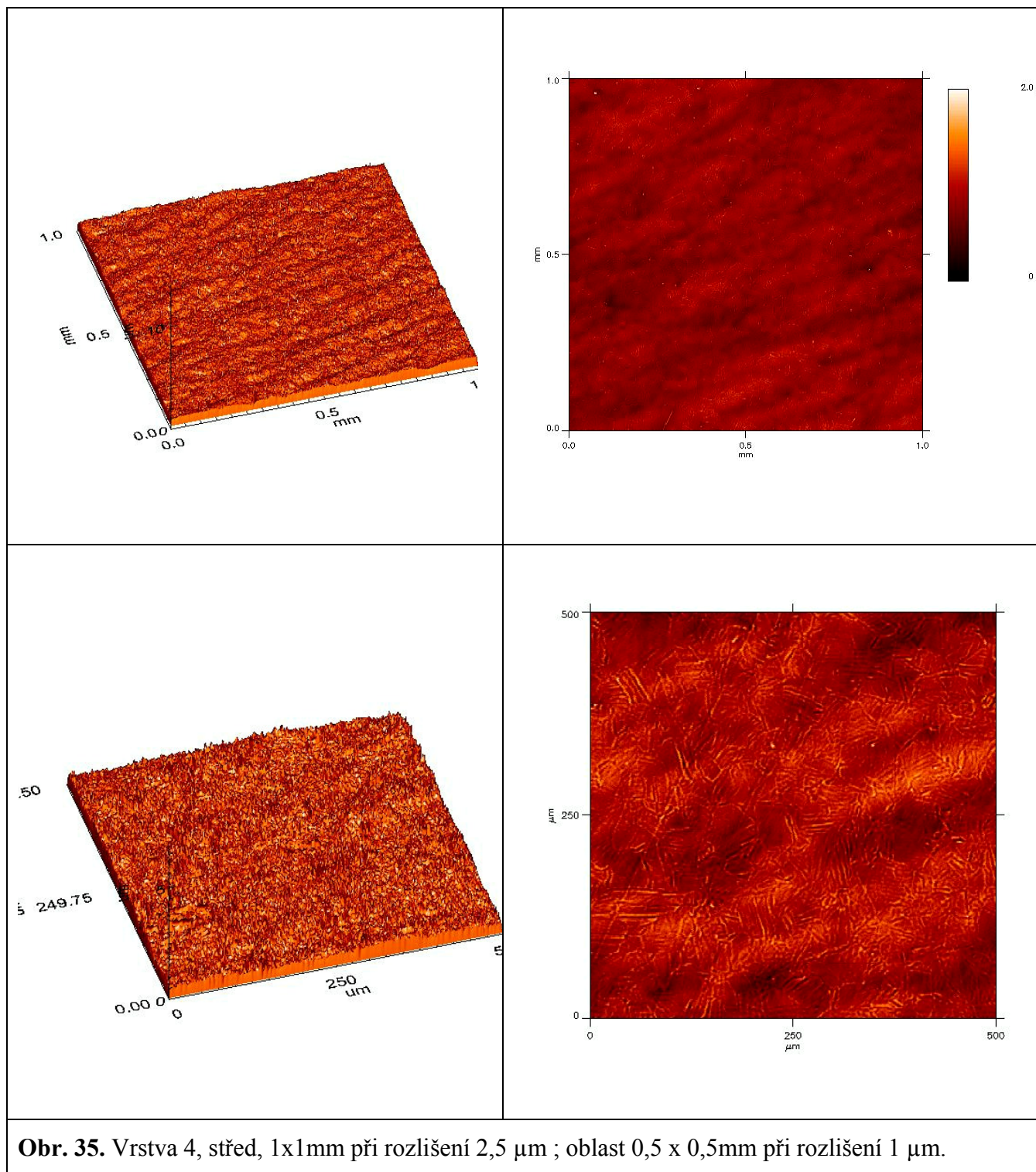
Obr. 33. Vrstva 2, 1x1mm při rozlišení 2,5 µm ; oblast 0,5 x 0,5mm při rozlišení 1 µm.

Vrstva 3



Obr. 34. Vrstva 3, 1x1mm při rozlišení 2,5 µm ; oblast 0,5 x 0,5mm při rozlišení 1 µm.

Vrstva 4



Obr. 35. Vrstva 4, střed, 1x1mm při rozlišení 2,5 μm ; oblast 0,5 x 0,5mm při rozlišení 1 μm .

Tab. 10. Hodnoty drsnosti povlakovaných vzorků a substrátu měřené opt. profilometrem

| Statistické hodnoty drsnosti vzorků s vrstvami 1 až 4 a substrátu $L_c = 0,125\text{mm}$ a $L_c = 0,250\text{mm}$. | | | | | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Vzorky | sRa [μm] | sRq [μm] | sRz (DIN) [μm] | sRmax [μm] | sRp [μm] | sRv [μm] | sRt [μm] |
| Substrát | 0.053 | 0.074 | 2.170 | 6.278 | 3.278 | 3.003 | 6.281 |
| | 0.069 | 0.099 | 2.149 | 6.281 | 3.315 | 2.966 | 6.281 |
| 1. | 0.051 | 0.066 | 1.024 | 1.697 | 1.349 | 0.398 | 1.747 |
| | 0.068 | 0.088 | 0.977 | 1.553 | 1.261 | 0.416 | 1.677 |
| 2. | 0.079 | 0.102 | 1.571 | 3.388 | 2.745 | 0.916 | 3.661 |
| | 0.085 | 0.110 | 0.989 | 1.514 | 0.514 | 1.000 | 1.514 |
| 3. | 0.059 | 0.075 | 0.878 | 1.413 | 1.003 | 0.501 | 1.504 |
| | 0.075 | 0.095 | 0.845 | 0.970 | 0.502 | 0.540 | 1.042 |
| 4. | 0.074 | 0.095 | 1.240 | 1.996 | 1.290 | 0.708 | 1.998 |
| | 0.082 | 0.104 | 0.922 | 0.958 | 0.579 | 0.438 | 1.018 |

Pozn: Ra....Roughness average; Rq...Root mean square; Rz... Mean roughness depth /ten point height; Rmax...Maximum roughness depth; Rp...Peak height; Rv...Valley depth; Rt...Roughness depth.

5.3.4 Kontaktní profilometr

Měření drsnosti bylo provedeno na katedře obrábění TUL na kontaktním profilometru od firmy Mitutoyo SV – 2000 s diamantovým kuželovým hrotem s vrcholovým úhlem 90° a zaoblením hrotu $5\mu\text{m}$, výsledky jsou uvedeny v následující **Tab.11**. Na zvolené délce nebylo možno v některých případech naměřit Rz z důvodu nedostatku potřebných bodů pro statistické vyhodnocení měření.

Tab. 11. Drsnost měřená kontaktním profilometrem

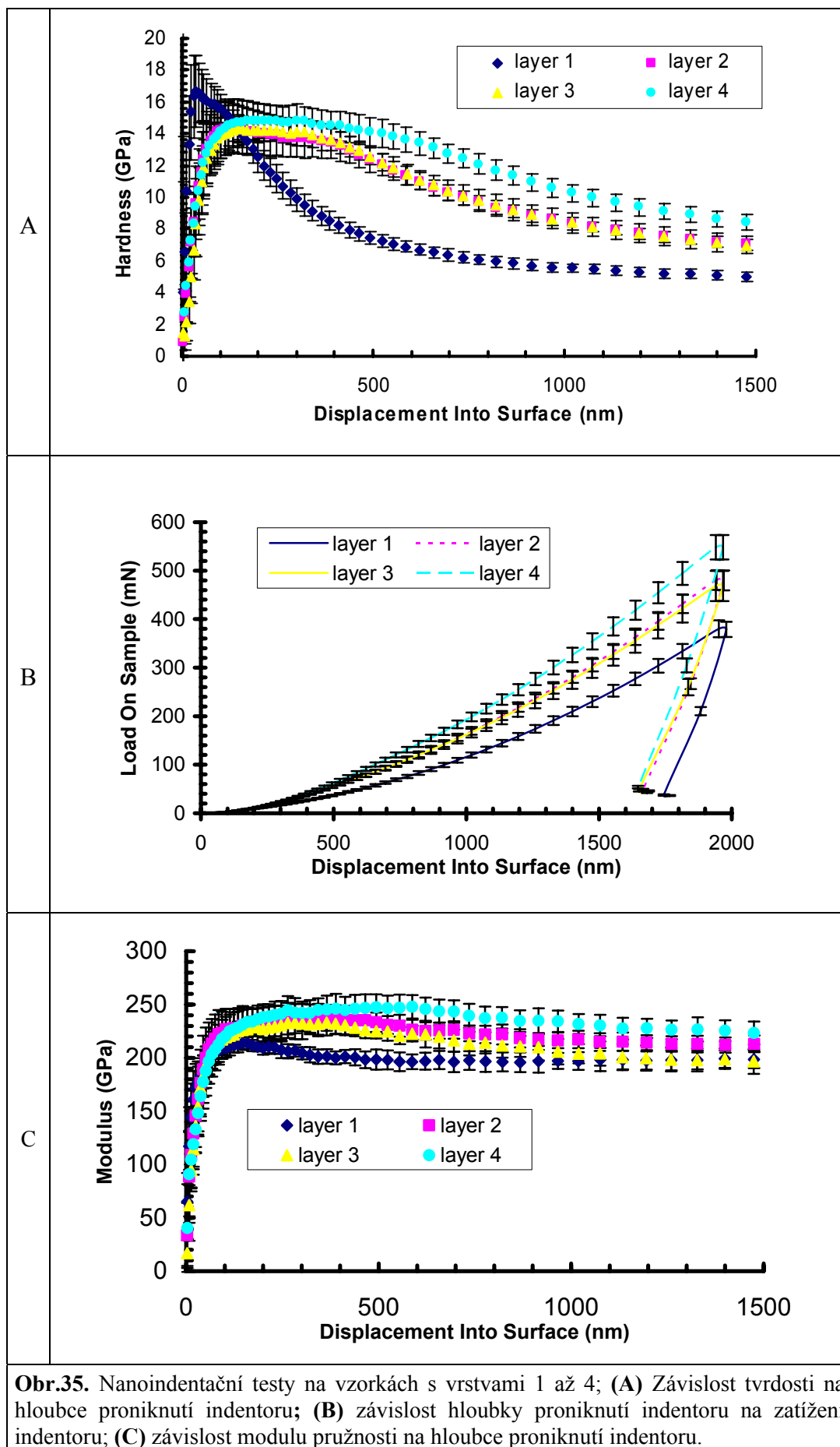
| Drsnosti vzorků s vrstvami 1 až 4 a substrátu pro $L_c = 0,125\text{mm}$ | | | |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Vzorky | Ra [μm] | Rt [μm] | Rz (ISO) [μm] |
| Substrát | 0,049 | 0,384 | - |
| 1. | 0,031 | 0,225 | 0,129 |
| 2. | 0,061 | 0,815 | 0,452 |
| 3. | 0,046 | 0,339 | - |
| 4. | 0,033 | 0,323 | 0,156 |

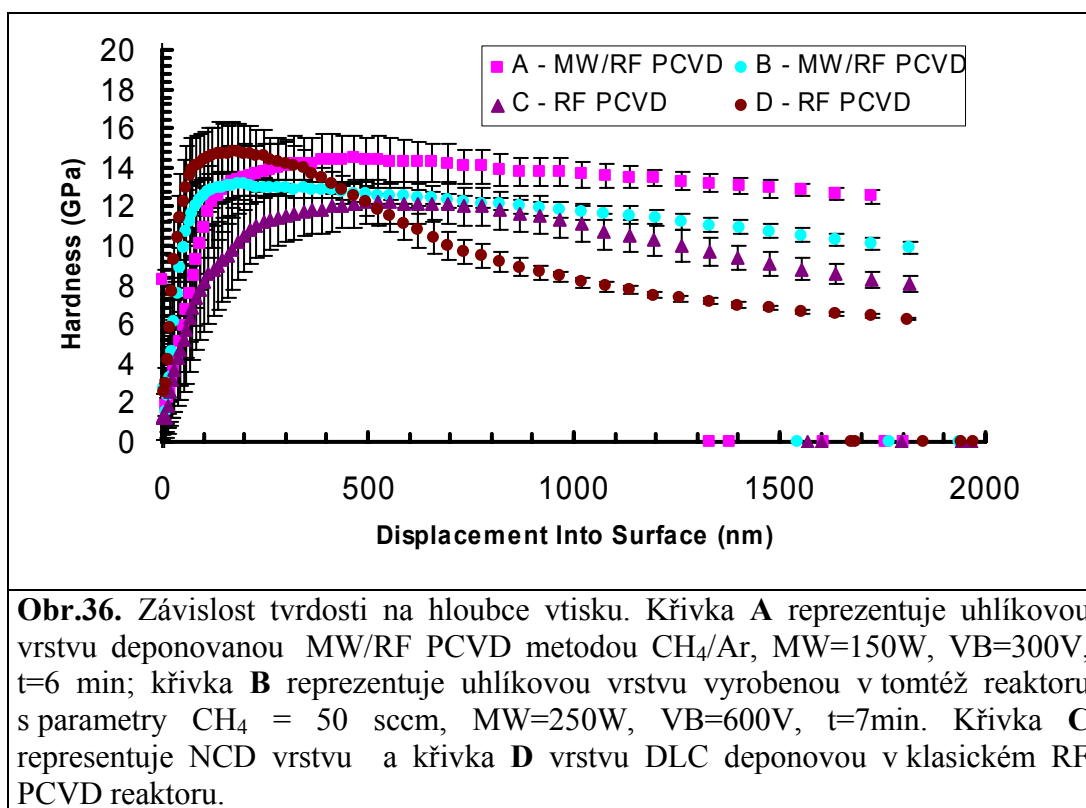
5.4 Nanoindentační testy

5.4.1 Berkovich

Indentační testy byly provedeny na přístroji NanoIndenter XP (f. MTS) s přídavným modulem CSM. Modul CSM (Continuous Stiffness Measurement - kontinuální měření tuhosti), který umožňuje měřit kontaktní tuhost kontinuálně v průběhu zatěžování, tedy ne pouze při maximální hodnotě proniknutí indenteru do materiálu. Při metodě CSM je k primárnímu zatížení superponováno velmi nízké oscilační zatížení s frekvencí 0,05 - 200 Hz a amplitudou 60 nN - 300 mN [129]. Modul CSM analyzuje dynamickou odezvu materiálu na tento způsob zatěžování, takže lze určovat tvrdost a indentační modul pružnosti kontinuálně v průběhu pronikání hrotu do materiálu. Metoda CSM je velmi vhodná pro hodnocení mechanických vlastností tenkých vrstev a filmů na substrátu, protože zaznamenává změnu mechanických vlastností jako funkci hloubky proniknutí indenteru do materiálu. Parametry zařízení: - maximální zatížení 10 N (1kg) při rozlišení 0,050 N (0,005kg), maximální hloubka vtisku indenteru do povrchu 500 μm při rozlišení $< 0,01\text{mm}$. [129, 130] Měření provedla Ing. Olga Bláhová, Ph.D. ze Západočeské univerzity v Plzni.

Při měření metodou CSM byl použit trojboký Berkovich indenter. Byla zvolena maximální hloubka vtisku 1,5 μm . Zaznamenány byly závislosti hloubky proniknutí indenteru na zatížení indenteru (indentační křivky) viz. **Obr.35B**. Dále byly sledovány závislosti naměřených hodnot nanotvrdosti na hloubce proniknutí indenteru viz. **Obr.35A**. Jedná se o průměrné hodnoty z pěti testů se směrodatnou odchylkou. Při měření byly vyhodnoceny závislosti naměřených hodnot indentačního modulu pružnosti na hloubce proniknutí indenteru **Obr.35C**. Vytvořené uhlíkové vrstvy reaktoru MW/RF PACVD na substrátu AISI 316 L vykazovaly hodnoty nanotvrdosti kolem 14 GPa a modulu pružnosti v rozmezí 211 – 232 GPa. Z porovnání hodnot z nanoindentačního měření nevyplývají velké rozdíly mezi jednotlivými vrstvami, nicméně je tu jistá preference u hodnot, které vykazuje vrstva z prvního depozičního procesu (přes 16 GPa), jejíž tloušťka je nižší.





Porovnání nanotvrdostí uhlíkových vrstev deponovaných v MW/RF PACVD a vrstev NCD, DLC vytvořených klasickou RF PCVD technikou je uvedeno v **Obr.36**. Pro měření byla zvolena maximální hloubka indentace $2\mu\text{m}$. V případě těchto vzorků byla substrátem opět ocel AISI 316L a příprava povrchu před depozicí proběhla stejným způsobem, jako u vzorků v našem případě.

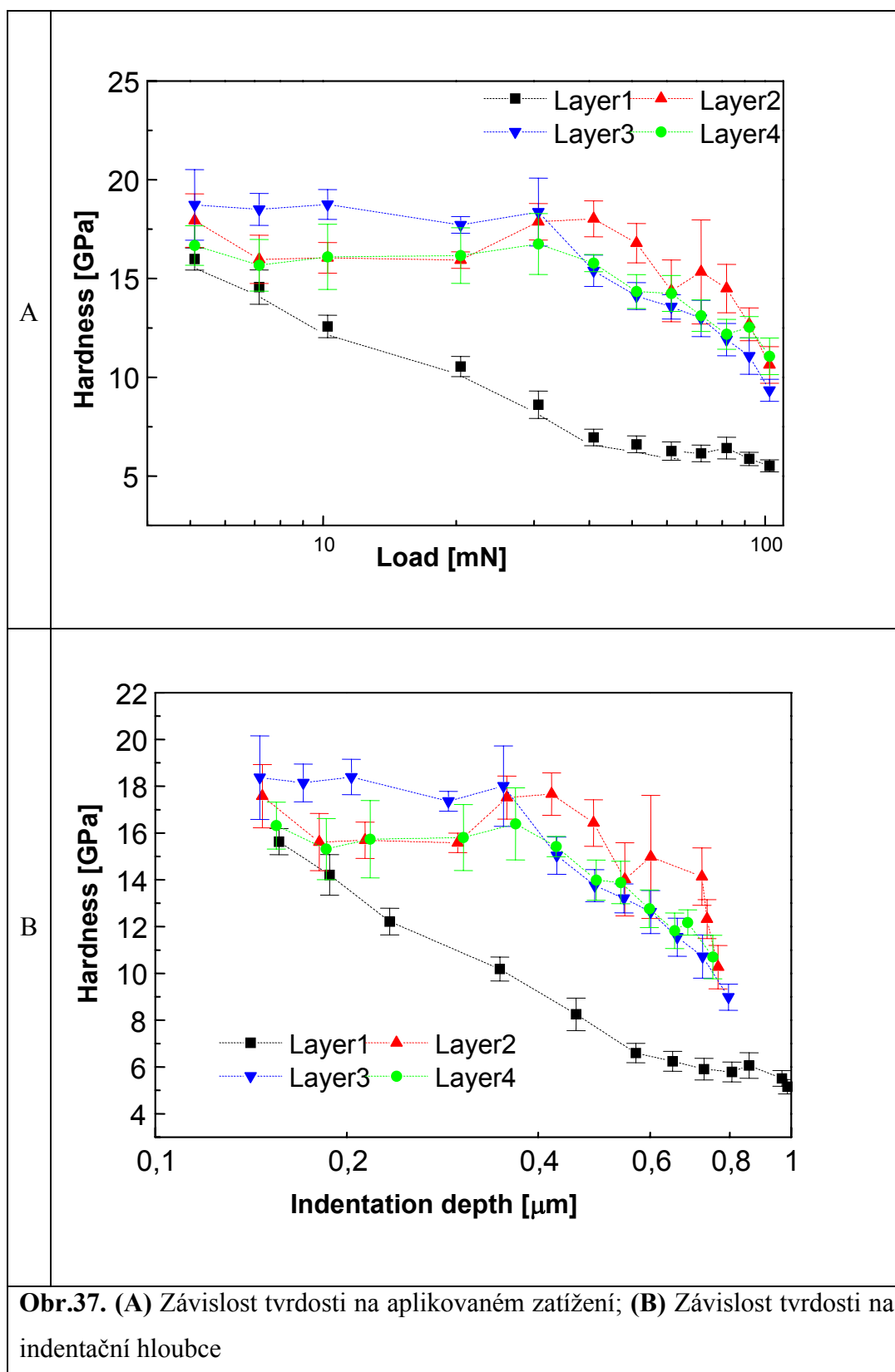
5.4.2 Vickers

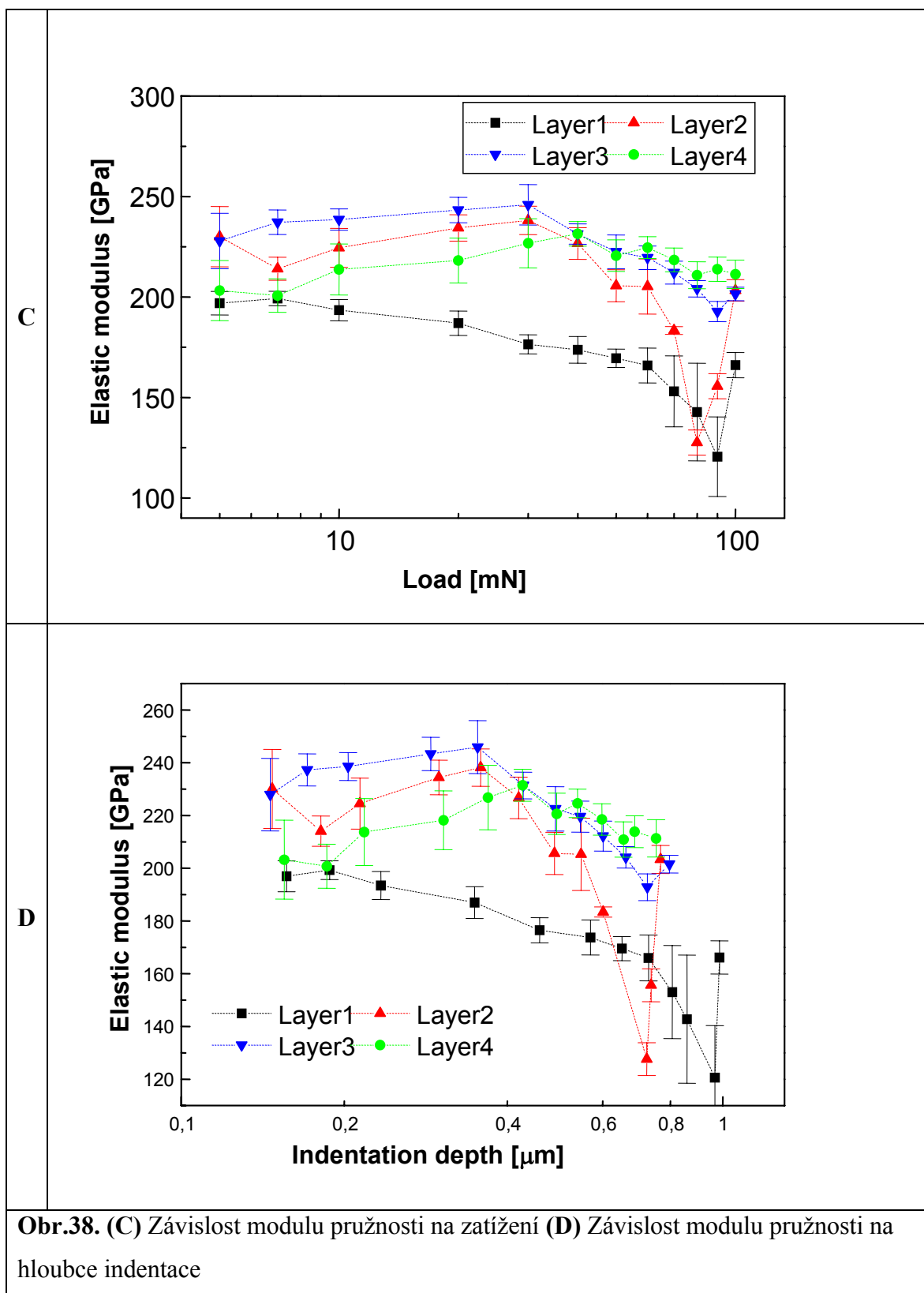
Depth sensing indentation - DSI analýza byla provedena na zařízení Frisherscope H100 DSI s indentorem Vickers, mikroskopem a CCD kamerou. Měření provedla RNDr. Vilma Buršíková, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

Zatížení použité na indentoru bylo v našem případě od 0,4 do 1000mN. Zařízení je schopno registrovat zatížení a dosaženou indentační hloubku, oboje jako funkci času. Zatěžovací perioda 20s byla následována výdrží 5s, odlehčovací fází 20s a ukončením po výdrži na minimu zatížení po dobu 5s. Několik testů bylo provedeno při různém maximálním indentačním zatížení (tzn. několika různých indentačních hloubek) pro sledování závislosti zatížení (hloubky) na zjištěných mechanických vlastnostech.

Nakonec bylo vybráno devět různých maximálních zatížení v intervalu od 5 do 1000 mN. Každý test byl opakován 9 až 16x kvůli minimalizaci experimentálních chyb. Spočtené mechanické charakteristiky byly zprůměrovány a byla stanovena pro každou studovanou charakteristiku míra spolehlivosti 95% (confidence level = CL).

Tvrдость vrstev viz. **Obr.37-38** se pohybuje cca mezi 15-18 GPa při indentačním modulu pružnosti 190-240 GPa. Z porovnání vychází nejlépe třetí a při tomto měření nejhůře vrstva první, která je i zřetelně tenčí, než vrstvy 2 až 4.

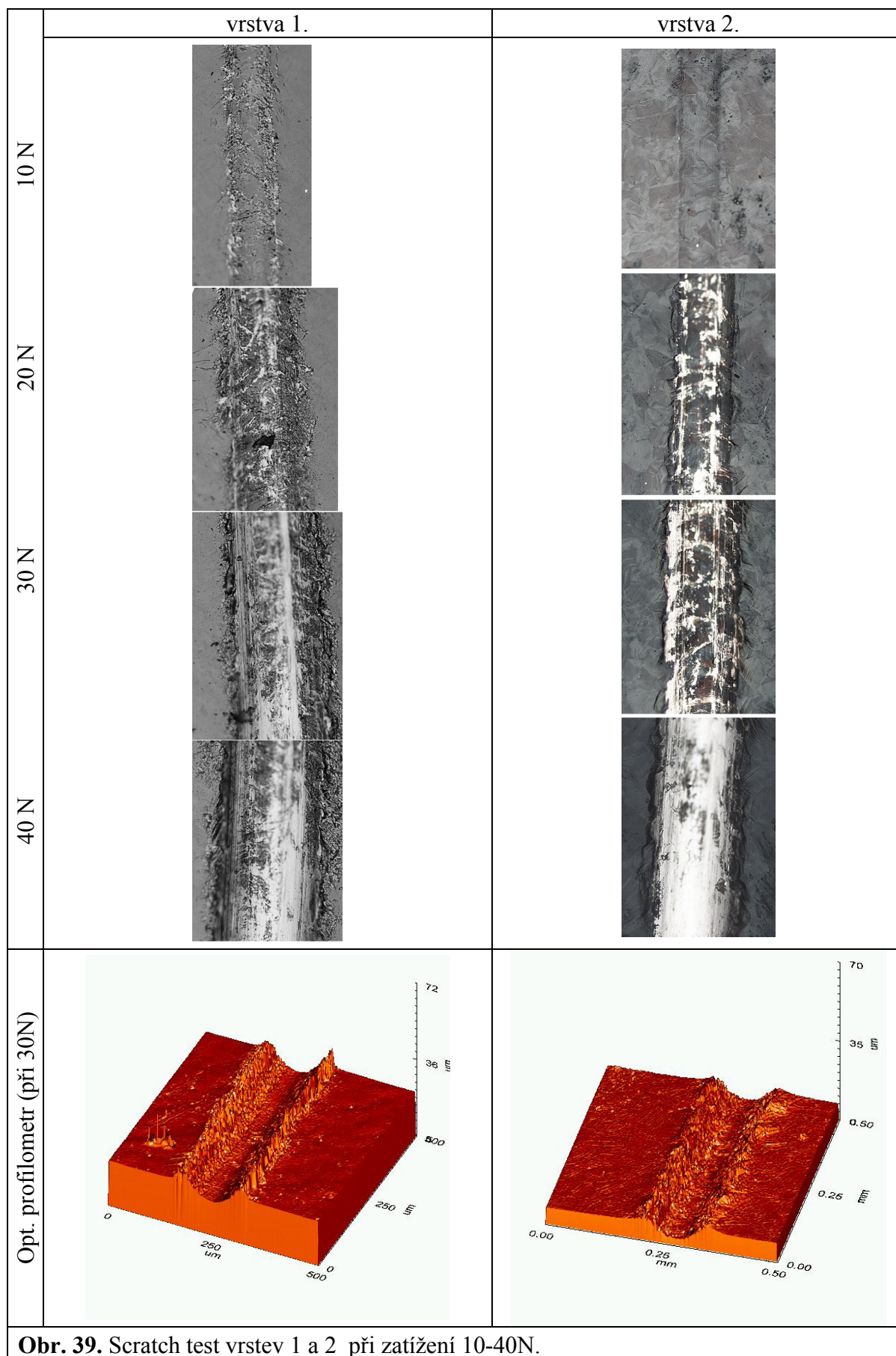








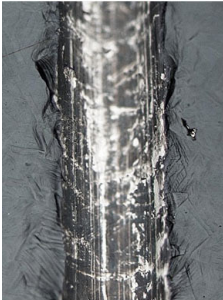



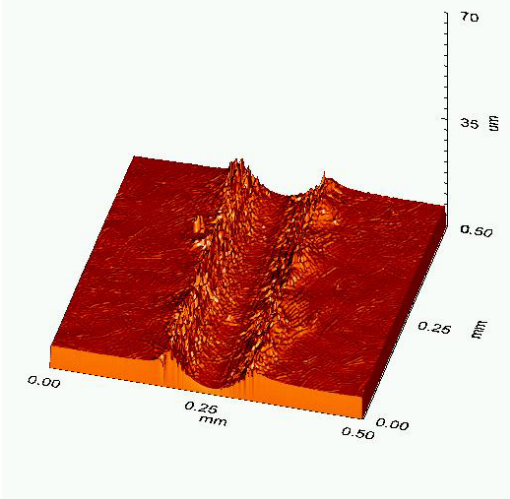
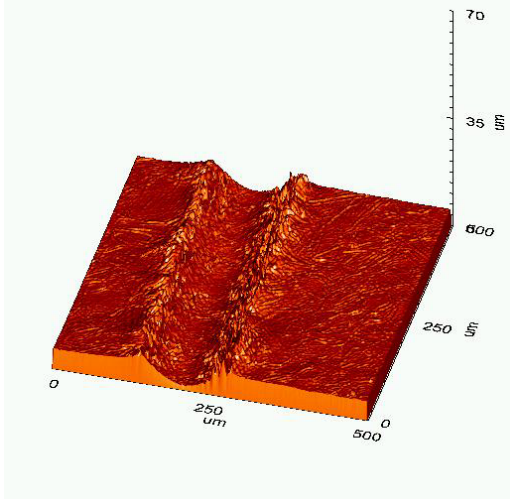
5.5 Scratch test

Test byl proveden na katedře materiálu TUL na přístroji Zwick 3212, stupňovitým zatížením 10 - 50N. Fotografie byly pořízeny mikroskopem Nikon EPIPHOT 200 při zvětšení 200x a zpracovány v programu LUCIA G. Scratch test byl proveden pomocí diamantového indentoru Rockwell s vrcholovým úhlem 120° se zaoblením 0,2mm.

Jak je zřejmé (**Obr.39-40.**) z fotografií scratch testu jednotlivých vrstev, všechny vrstvy (tloušťka max.1μm) neodolaly vyššímu zatížení než 20-30N, kdy se začal odhalovat substrát. Kraje rýh se neodlupovaly ve velkých kusech, ale po jemných částech. To je dobře patrné i ze scanů z optického profilometru (oblast 500 x 500μm při rozlišení 1μm). Materiál vrstvy je nahnut a „zvednut“ podél rýhy, kde se drobivě uvolňuje. Vrstva z prvního procesu byla narušena již při zatížení 10N.



Obr. 39. Scratch test vrstev 1 a 2 při zatížení 10-40N.

| | vrstva 3. | vrstva 4. |
|----------------------------|---|---|
| 10 N |  |  |
| 20 N |  |  |
| 30 N |  |  |
| 40 N |  |  |
| Opt. profilometr (při 30N) |  |  |

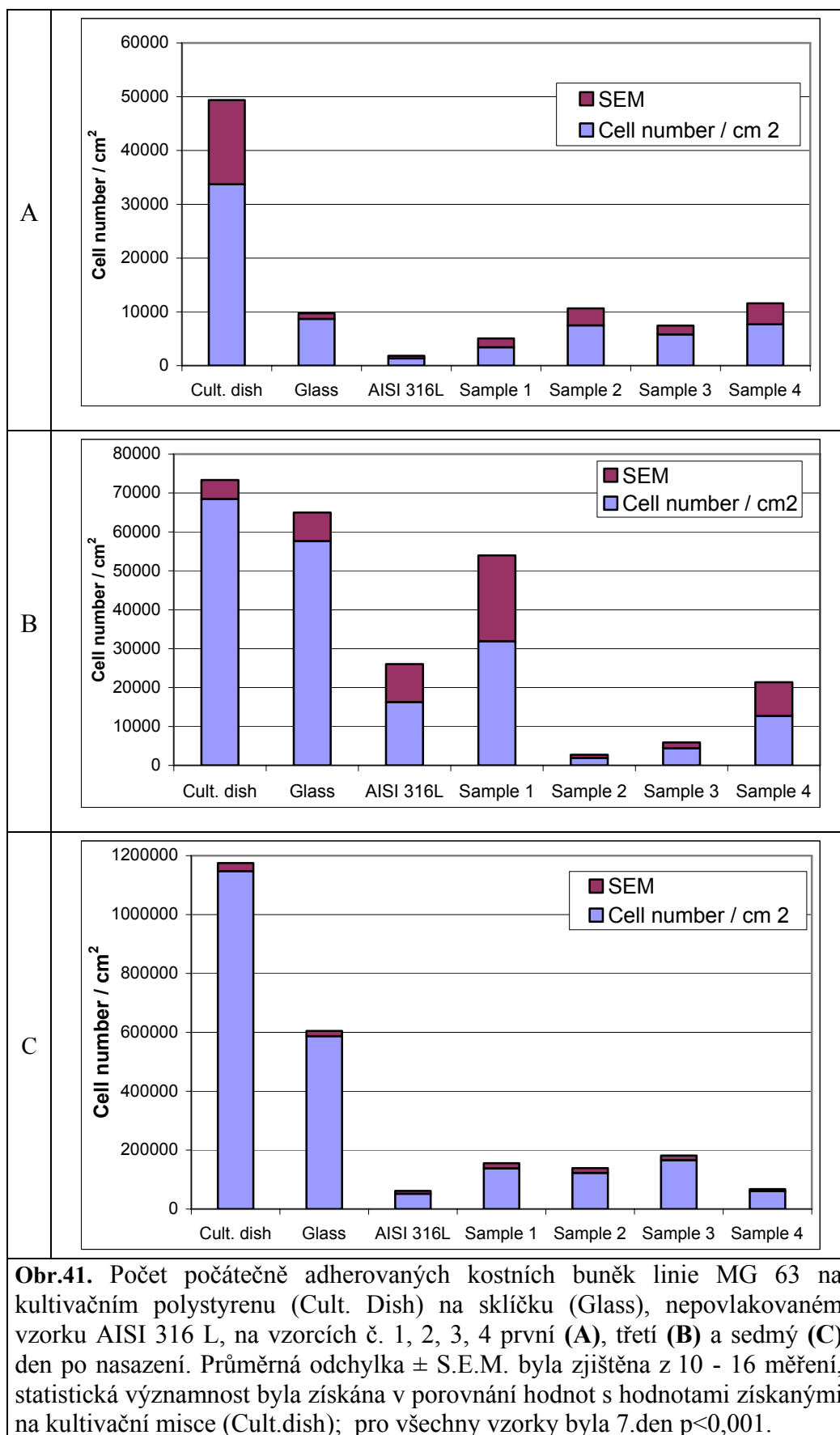
Obr. 40. Scratch test vrstev 3 a 4 při zatížení 10-40N.

5.6 Adheze a proliferace osteoblastů

Vzorky byly ponořeny do tkáňové vody a sterilizovány 20 minut v parním autoklávu při teplotách kolem 120°C. Poté byly umístěny do polystyrénových laboratorních multi-misek (Costar, 24 misek, průměr 15mm) a na ně byly nasazeny lidské kostní buňky linie MG 63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) společně s Dulbecco médiem v hustotě 30 000 buněk/misku. Jako kontrolní materiály bylo použito sklo a polystyren - materiál kultivační misky. Buňky byly kultivovány v inkubátoru 1, 3 a 7 dní při teplotě 37°C v atmosféře vzduchu s 5 % CO₂. První a třetí den po nasazení byly buňky propláchnuty roztokem PBS (Phosphate-Buffered Saline), fixovány 70% chlazeným etanolem (-20°C, 5 min) a vizualizovány propidium jodidem (5 µg/ml, 5 min). Morfologie buněk byla vyhodnocena a zdokumentována epifluorescenčním mikroskopem IX 50 vybaveným digitální kamerou DP 70 (Olympus, Japonsko) viz. **Obr. 43**. V některých případech byla použita pro lepší vizualizaci fluorescenční sada PHK 26 RED. Sedmý den po nasazení buněk, kdy již počítání buněk v mikroskopickém poli vzhledem k jejich velkému počtu a vrstvení není možné, byly buňky izolovány trypsinem – EGTA po dobu 5 minut o teplotě 37°C a počítány pomocí Bürkrova homeocytometru (18 měření pro každý vzorek). [131,132]

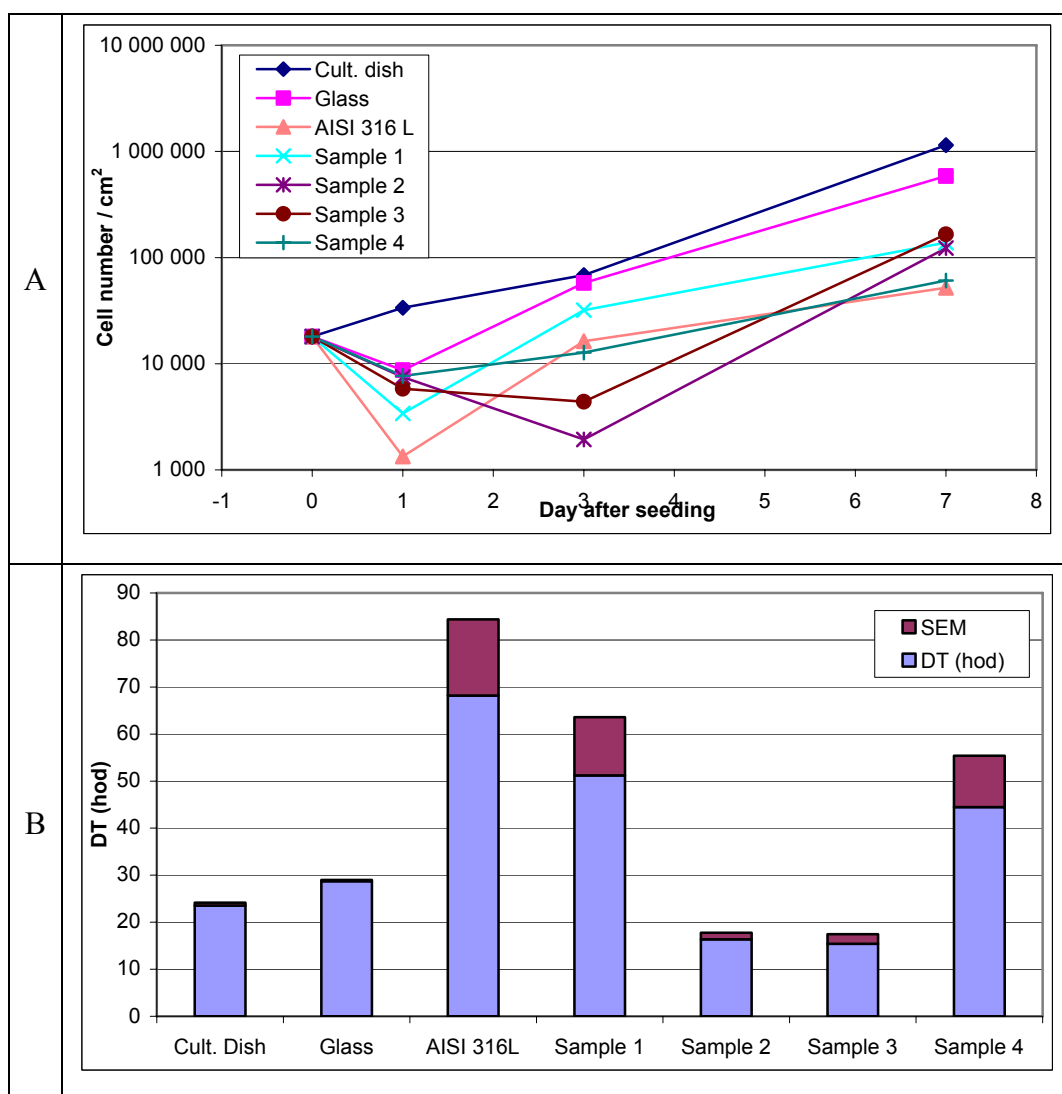
Počty počátečně adherovaných buněk první den po nasazení **Obr.41A** byly na všech sledovaných vzorcích nižší než na kultivačním polystyrenu a než na kontrolním sklíčku. Pořadí po prvních 24 hodinách dle počtu adherovaných buněk: polystyren > sklo > vzorek 4 > vzorek 2 > vzorek 3 > vzorek 1 > AISI 316 L. V porovnání s nepovlakovaným vzorkem AISI 316 L byl počet buněk na povlakovaných vzorcích výrazně vyšší. Mezi prvním a třetím dnem **Obr.41B** se zvýšil počet adherovaných buněk v tomto pořadí: polystyren > sklo > vzorek 1 > AISI 316 L > vzorek 4 > vzorek 3 > vzorek 2. Na vzorcích byla vidět jasná preference růstu buněk na krajích vzorků. Byly zřetelně pozorovatelné shluky buněk na okrajových oblastech vzorků zatímco uprostřed se objevovaly jen izolované.

Sedmý den po nasazení buněk byla stále největší proliferace buněk na polystyrenu a na skle viz. **Obr.41C**. Žádný ze vzorků neměl lepší adhezi buněk. Počet adherovaných buněk byl v tomto pořadí: polystyren > sklo > vzorek 3 > vzorek 1 > vzorek 2 > vzorek 4 > AISI 316 L. Větší aktivita buněk byla sledována na povlakovaných vzorcích než na nepovlakovaném a byla patrná menší preference vzorku číslo tři.

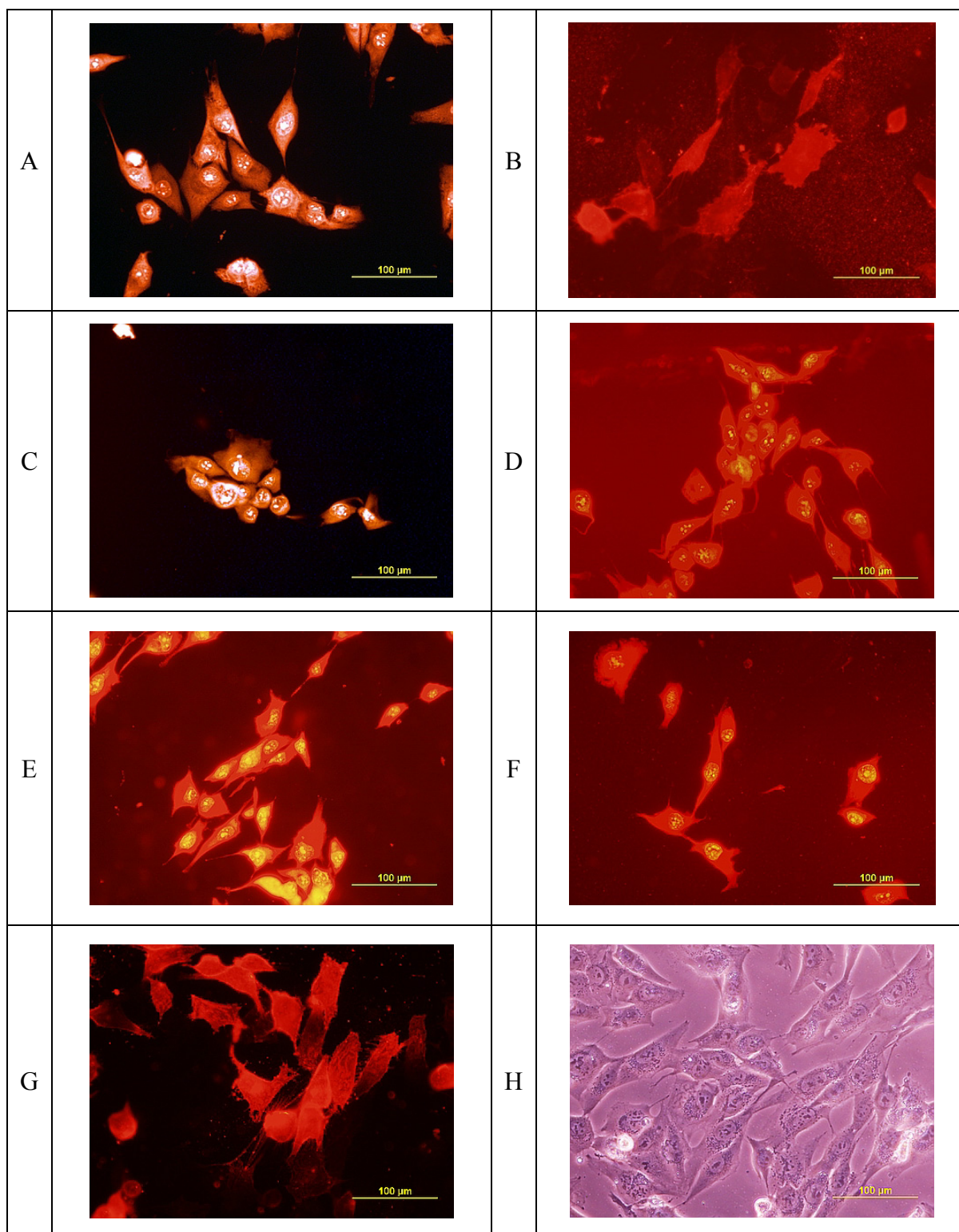


Průměrné množství buněk na všech sledovaných vzorcích ze všech sedmi dnů bylo sestaveno do růstových křivek na **Obr.42.A**. Ze statistických hodnot ze třetího a sedmého dne byl vyhodnocen doubling time DT, kde vykazuje nejkratší čas vzorek 3 následovaný vzorkem 2, polystyrenem, sklem, vzorkem 4, vzorkem 1 a nakonec AISI 316 L viz.**Obr. 42.B**.

Data byla statisticky prezentována jako \pm S.E.M. z 10 - 16 měření získaných z 1 vzorku pro každou ze 3 sledovaných paralelních skupin. Statistická významnost byla vyhodnocena Studentovým t-testem v porovnání s hodnotami získanými na polystyrénové kultivační misce (Cult.dish).



Obr.42. Počet iniciálně adherovaných kostních buněk linie MG 63 (**A**) růstové křivky buněk mezi dny 0 - 7 (**B**) populační „doubling time“ mezi dny 3 – 7 po nasazení buněk na: polystyren (Cult.dish), sklo (Glass), nepovlakovaný substrát AISI 316 L a povlakovaný vzorek 1, 2, 3, 4.



Obr.43. Morfologie kostních buněk linie MG 63 čtyřia dvacet hodin po jejich nasazení na vzorky, obarvené propidium iodidem popřípadě červeným fluorescenčním barvivem; epifluorescence. (A) polystyren (B) sklo (C) vzorek 1 (D) vzorek 2 (E) vzorek 3 (F) vzorek 4, (G) AISI 316 L, (H) nativní buňky v médiu na kultivační misce.

6. Experiment II

Jak vyplývá z výsledků studií popsaných v první části této práce, mají Diamond Powder Particles speciální účinky na lidské buňky. Studie prokázaly velmi dobré výsledky při in vitro a in vivo testech. DPP je biokompatibilní biomateriál pro lidskou kůži. Pozitivní účinky na lidské buňky byly prokázány při studiích s Diamond Powder Particles vytvořených jak v RF PCVD reaktoru tak i detonační metodou.

Cílem experimentu bylo prokázat možné protizánětlivé a antibakteriální účinky při in vivo testech s *Diamond Powder Particles* (DPP) vytvořených metodou MW/RF PACVD na lidské kůži tedy na lidských kožních buňkách. Popřípadě zjistit možné závislosti účinnosti diamantových prášků na parametrech procesu jejich vytváření a na použité koncentraci.

Všechny testy popsané v následujících kapitolách byly provedeny na dobrovolnících v Institutu Medycyny Pracy Im. Prof.J.Nofera na oddělení Przychodnia Chorób Zawodowych v Lodži pod dohledem dr. Marty KeiĆ-Świerczyńskiej, dr.Beaty Kręncisz a dr. Katarzyny Mitury.

V rámci experimentů s Diamond Powder Particles byly provedeny následující testy:

- SEM analýza prášků
- Epikutánní testování masti s DPP ve srovnání s účinky léku Elocorn
- Antibakteriální testy na devíti dobrovolnících s mastí s DPP a mastí Mupirox
- Porovnání účinků masti s DPP a antimykotikem Mykoseptin

6.1 Příprava Diamond Powder Particles

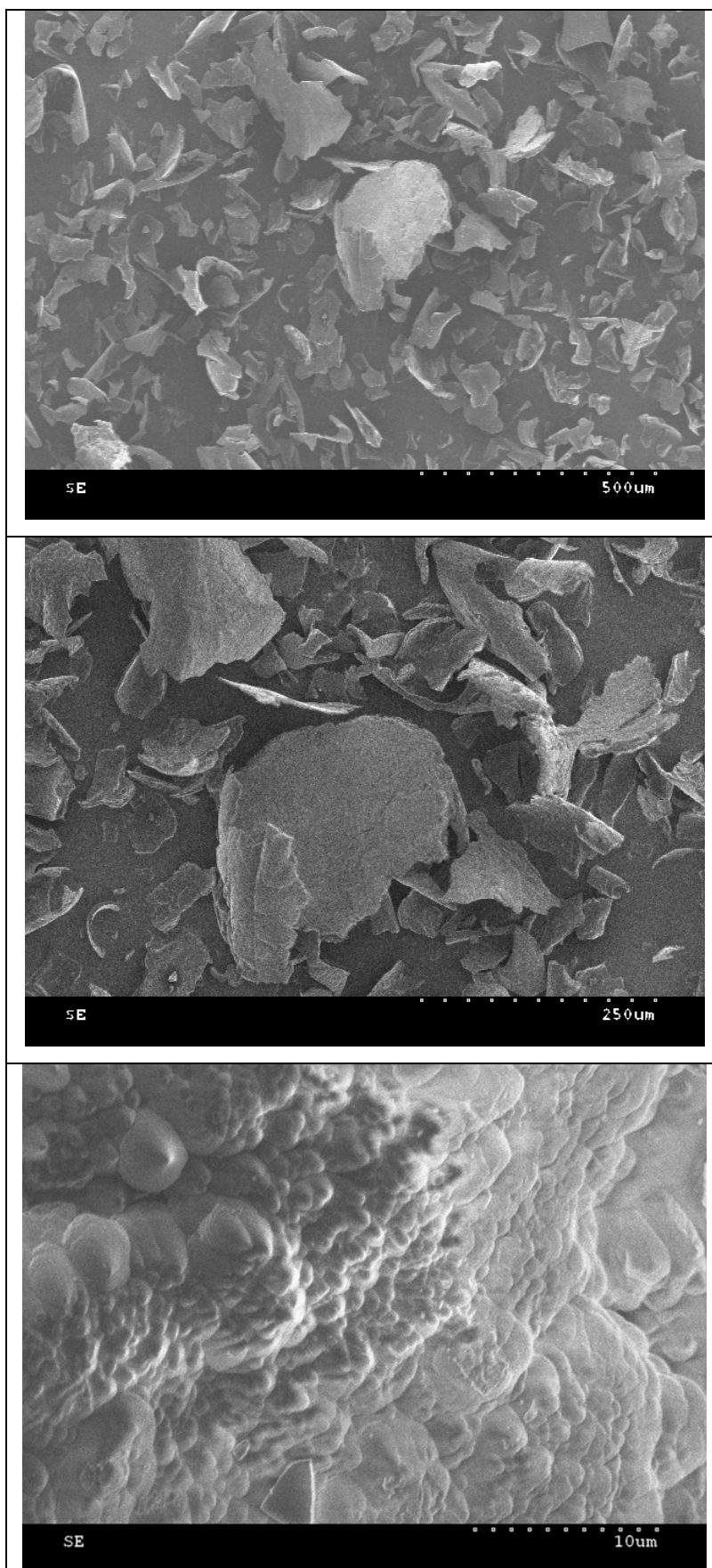
Pro naši studii byl použit prášek DPP (*Diamond Powder Particles*), který byl vytvořen v Centru Nanodiamond Excellent na Technické Univerzitě v Lodži. Pro testy jsme použili celkem dva prášky DPP 1 (diamantový prášek typu 1) a DPP 2 (diamantový prášek typu 2) lišící se procesními parametry vytváření. Parametry, při kterých byly prášky vytvořeny MW/RF PACVD metodou, jsou popsány v **Tab.12.**, podrobnější popis reaktoru viz. kapitola 5.1.

Tab.12. Parametry vytvoření Diamond Powder Particles 1 a 2 v MW / RF PACVD reaktoru.

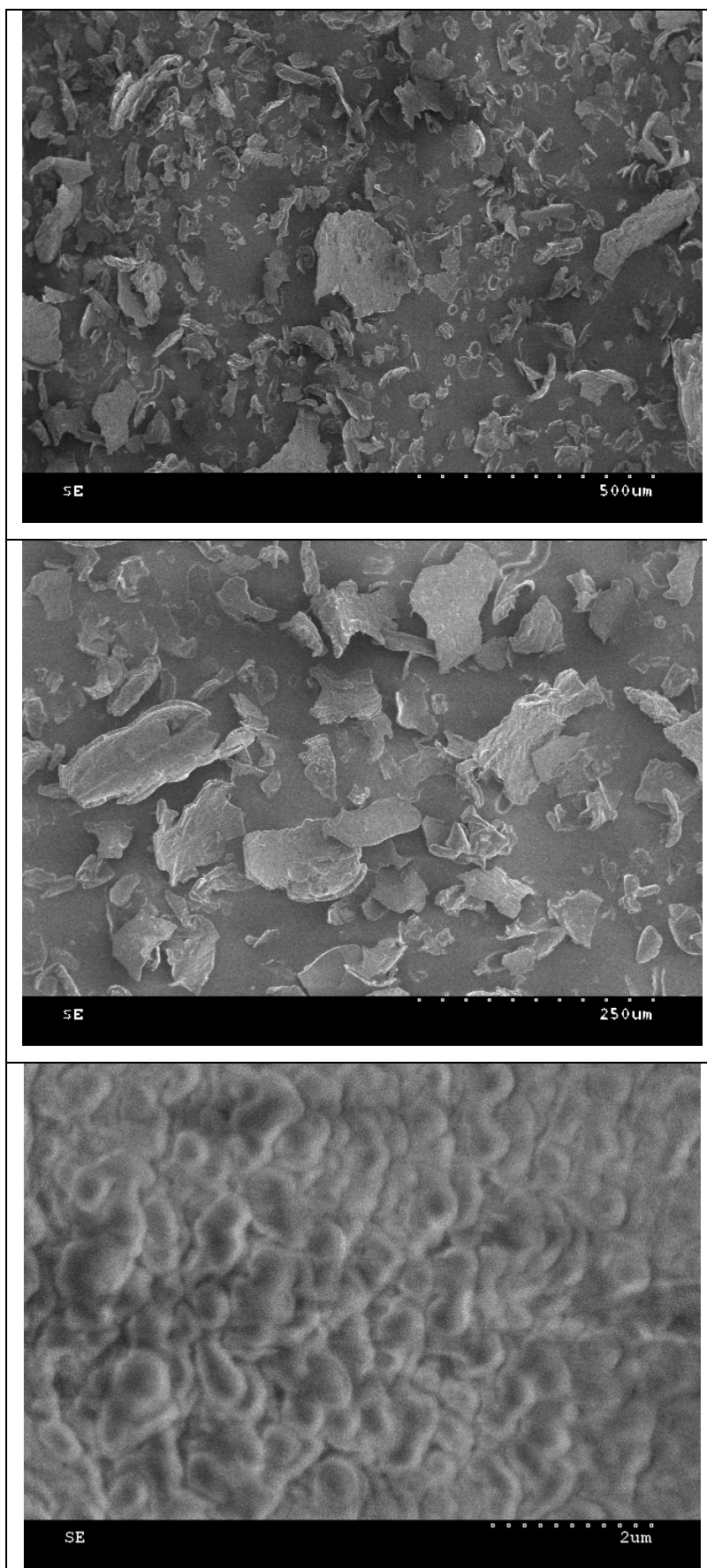
| Proces | Průtok CH ₄ [Scm] | Záporné předpětí na elektrodě V _B [V] | MW Výkon [W] | RF Výkon [W] | Tlak [Pa] | Délka procesu [h] |
|--------|------------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------|-------------------------|
| DPP 1 | 90 | 550 – 600 | 345 | ~ 1000 | 80 | ~ 1 |
| DPP 2 | 100 | 400 - 450 | 450 | ~ 500 | 90 | |

6.2 SEM analýza prášků

Analýza prášků byla provedena v Institute of Material Engineering, Technical University of Lodz, Poland, na rastrovacím elektronovém mikroskopu značky HITACHI S-3000N, který podporuje vizualizaci za tlaku 1 až 270 Pa. Pro naše prášky bylo použito zvětšení 90x, 180x, 3500x (15 000x). Snímky obou diamantových prášků pořízené elektronovým mikroskopem jsou uvedeny v **Obr.44 - 45.** na následujících stranách. Prášek typu 2 vykazoval jemnější zrnitost než prášek typu 1. Obecně lze říci, že je výhodná nižší zrnitost prášků, pro větší aktivní povrch. Velikosti zrn sledovaných na klastrech v prášku DPP 1 se pohybovala cca od 0,6μm a u DPP 2 od 0,2μm.



Obr.44. SEM snímky Diamond Powder Particles typu 1



Obr.45. SEM snímky Diamond Powder Particles typu 2

6.3 Příprava masti s DPP

S oběma typy vytvořených prášků byly dle jednoduché receptury připraveny základní masti **Obr.46.** a to přímo v lékárně nemocnice Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 1 im. Norberta Barlickiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Jako základ pro masti byla použita pouze čistá bílá vazelína – Vaselinum album. Vaselinum album se užívá zejména jako masťový základ pro zevní léky. Je hypoalergenní, neparfemovaná a nebarvená. Masti s diamantovými prášky o koncentraci 0,005% (5mg prášku a 10g bílé vazelíny), 0,5% (50mg prášku a 10g bílé vazelíny) a 1% (100mg prášku a 10g bílé vazelíny) byly použity pro prvotní srovnávací patch testy se steroidy a porovnávací antibakteriální testy s antibiotikem.



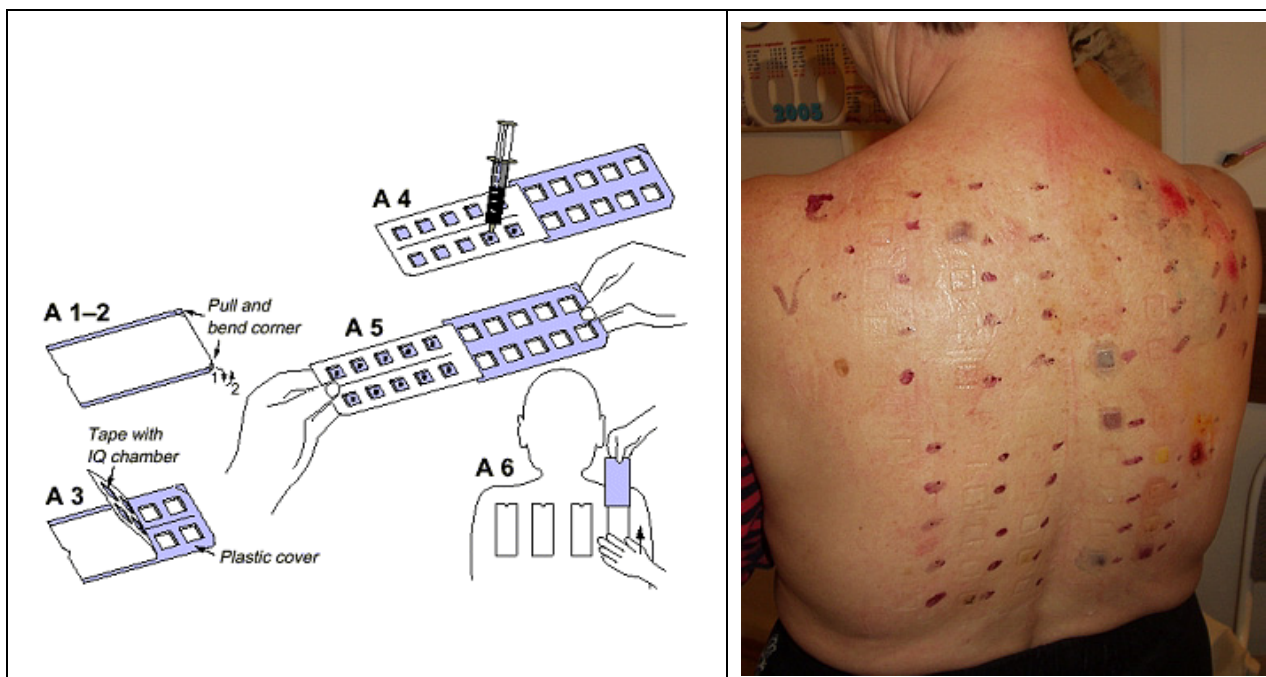
Obr.46. Příprava masti z Diamond Powder Particles

6.4 Patch testy

Patch testy tedy epikutánní testy jsou základním kamenem diagnostiky kontaktní alergické dermatitidy. Obvykle jsou na horní polovinu zad nanесeny (v bílé jemné parafínové bázi umístěné do inertních polyethylenových plastových okének) různé standardní alergenы viz **Obr.47A**. Alergen se aplikuje v dostatečném množství (15 - 30 μ l, v závislosti na typu použité testovací náplasti). Alergeny jsou ponechány v kontaktu s kůží 48 hodin, poté jsou

testovací náplasti odstraněny viz **Obr.47B.** a je hodnocena reakce kůže s alergenními substancemi, konečné hodnocení se provádí třetí až čtvrtý den. Za pozitivní reakci je považována zánětlivá ekzémová reakce s papulami a/nebo infiltrací s crescendo či plateau charakterem reakce při dalším odečtu.

Pro experiment byla použita diagnostická souprava pro epikutánní testování Chemotechnique Patch Test Kit od švédského výrobce Chemotechnique Diagnostics AB. Složení alergenů viz. **Tab.13.** [126]



Obr.47.(A) Do inertních plastových okének s jemnou parafínovou bází se aplikují alergen, náplasti se poté nalepí nejčastěji na horní polovinu pacientových zad. [126] **(B)** Po odlepení patch testu se označí místa umístění jednotlivých okének s alergenem a hodnotí se reakce kůže.

Možný způsob hodnocení reakce:

- negativní
- ? pochybná reakce
- + slabá pozitivní reakce (erytém, infiltrace, sporadické papulky)
- ++ silná pozitivní reakce (erytém, infiltrace, edém, papulky, drobné vesikuly)
- +++ velmi silná pozitivní reakce (intenzivní erytém, infiltrace, splývající vesikuly, mokvání)
- IR iritační reakce různého typu (např. jemné zvrásnění - hedvábný papír, erytém a folikulární papuly, petechie, pustuly, buly, nekróza s malou infiltrací)

Tab.13. Epikutánní alergeny, Evropský standard [126]

| Evropský standard (S-1000): | | | | |
|------------------------------------|--|---|-----------------------------|--------------------------|
| Číslo | Alergen | Koncentrace (v % w/w) | Pomocná látka | Koncentrace (v % w/w) |
| 1. | Potassium dichromate/Dvojchroman draselný | 0,5 | Vazelína bílá | 99,50 |
| 2. | 4-Phenylenediamine base/Parafenylenlamin | 1,0 | Vazelína bílá | 99,50 |
| 3. | Thiuram mix/Thiuramová směs Tetramethylthiuram monosulfite (TMTM) Tetramethylthiuram disulfite (TMTD) Tetraethylthiuram disulfite (TETD) Dipentamethylenethiuram disulfite (PTD) | 1,0 0,25% 0,25% 0,25% 0,25% | Vazelína bílá | 99,50 |
| 4. | Neomycin sulfate/Neomycin | 20,0 | Vazelína bílá | 80,00 |
| 5. | Cobalt chloride hexahydrate/Chlorid kobaltnatý . 6H ₂ O | 1,0 | Vazelína bílá | 99,00 |
| 6. | Benzocaine/Benzokain | 5,0 | Vazelína bílá | 95,00 |
| 7. | Nickel sulfate hexahydrate/Síran nikelnatý . 6 H ₂ O | 5,0 | Vazelína bílá | 95,00 |
| 8. | Clioquinol/Kliočinol | 5,0 | Vazelína bílá | 95,00 |
| 9. | Colophony/Kalafuna | 20,0 | Vazelína bílá | 80,0 |
| 10. | Paraben mix/Parabeny směs Methyl-4-hydroxybenzoate Ethyl-4-hydroxybenzoate Propyl-4 hydroxybenzoate Butyl-4-hydroxybenzoate | 16,0 4,0% 4,0% 4,0% 4,0% | Vazelína bílá | 85,00 |
| 11. | N-Isopropyl-N-phenyl-4-phenylenediamine Isopropylfenylparafenylenlamin (IPPD) | 0,1 | Vazelína bílá | 99,10 |
| 12. | Wool alcohols/Alkoholy tuku z ovčí vlny | 30,0 | Vazelína bílá | 70,00 |
| 13. | Mercapto mix/Merkapto směs N-Cyclohexyl-2-benzothiazyl sulphenamide 2-Mercaptobenzothiazole Dibenzothiazyl disulfide 2-(4-Morpholinylmercapto)benzothiazol | 2,0 0,5% 0,5% 0,5% 0,5% | Vazelína bílá | 98,00 |
| 14. | Epoxy resin/Epoxidová pryskyřice | 1,0 | Vazelína bílá | 99,00 |
| 15. | Balsam Peru /Peruánský balzám (emulgátor: Sorbitan sesquioleate) | 25,0 | Vazelína bílá | 75,00 |
| 16. | 4-tert-Butylphenol formaldehyde resin Butylfenolformaldehydová pryskyřice | 1,0 | Vazelína bílá | 99,00 |
| 17. | 2- Mercaptobenzothiazole/ Merkaptoenzothiazol (MBT) | 2,0 | Vazelína bílá | 98,00 |
| 18. | Formaldehyde solution /Formaldehyd roztok | 1,0 (aktivní) | Milipore filtr.voda | 99,00 |
| 19. | Fragrance mix /Parfémová směs Cinnamic alcohol Cinnamic aldehyde Hydroxycitronellal Amylcinnamaldehyde Geraniol Eugenol Isoeugenol Oakmoss absolute | 8,0 1,0% 1,0% 1,0% 1,0% 1,0% 1,0% 1,0% 1,0% | Vazelína bílá | 92,00 |
| 20. | Sesquiterpene lactone mix/Sesquiterpenlaktónová směs Alantolactone Dehydrocostus lactone + Costunolide | 0,1 0,033 0,067 | Vazelína bílá | 99,90 |
| 21. | Quaternium 15/Quaternium 15 | 1,0 | Vazelína bílá | 99,00 |
| 22. | Primin /Primin | 0,01 | Vazelína bílá | 99,99 |
| 23. | Cl +Me-isothiazolinone Kathon CG, 100 ppm | 0,01 | Milipore filtrovaná voda | 99,00 |
| 24. | Budesonide /Budesonid | 0,01 | Vazelína bílá | 99,99 |
| 25. | Tixocortol-21-pivalate/Tixocortol pivalát | 0,1 | Vazelína bílá | 99,90 |
| 26. | Methyldibromoglutaronitrile (1,2-Dibromo-2,4,- dicyanobutane) | 0,5 | Vazelína bílá | 99,50 |

6.4.1 Mast s DPP versus Elocom

První pacient

Prvním pacientem byl umělec zabývající se tvorbou plastik, který je hypersenzitivní na nikl, kadmium, molybden a další látky například formaldehyd. U pacienta byla po standardním patch testu ještě prokázána alergie na Euxyl K 400 (Methyldibromoglutaronitrile - MDBGN) viz **Obr.48**. Euxyl K 400 se skládá ze dvou složek (1,2-dibromo-2,4dicyanobutane a 2-phenoxyethanol), je to konzervační prostředek používaný v kosmetice a v průmyslových produktech, který se v Evropě používá od roku 1985, kdy byl uveden na trh. [133] Od července roku 2004 je zakázáno MDBGN používat v kosmetických výrobcích typu „leave on“ (jež zůstávají po určitou dobu na lidském těle) a povolen v produktech typu „rinse off“ v koncentracích max. 0,1%. Od roku 2005 je MDBGN o koncentraci 0,5% ve vazelině součástí Evropského standardu alergenů. [134]

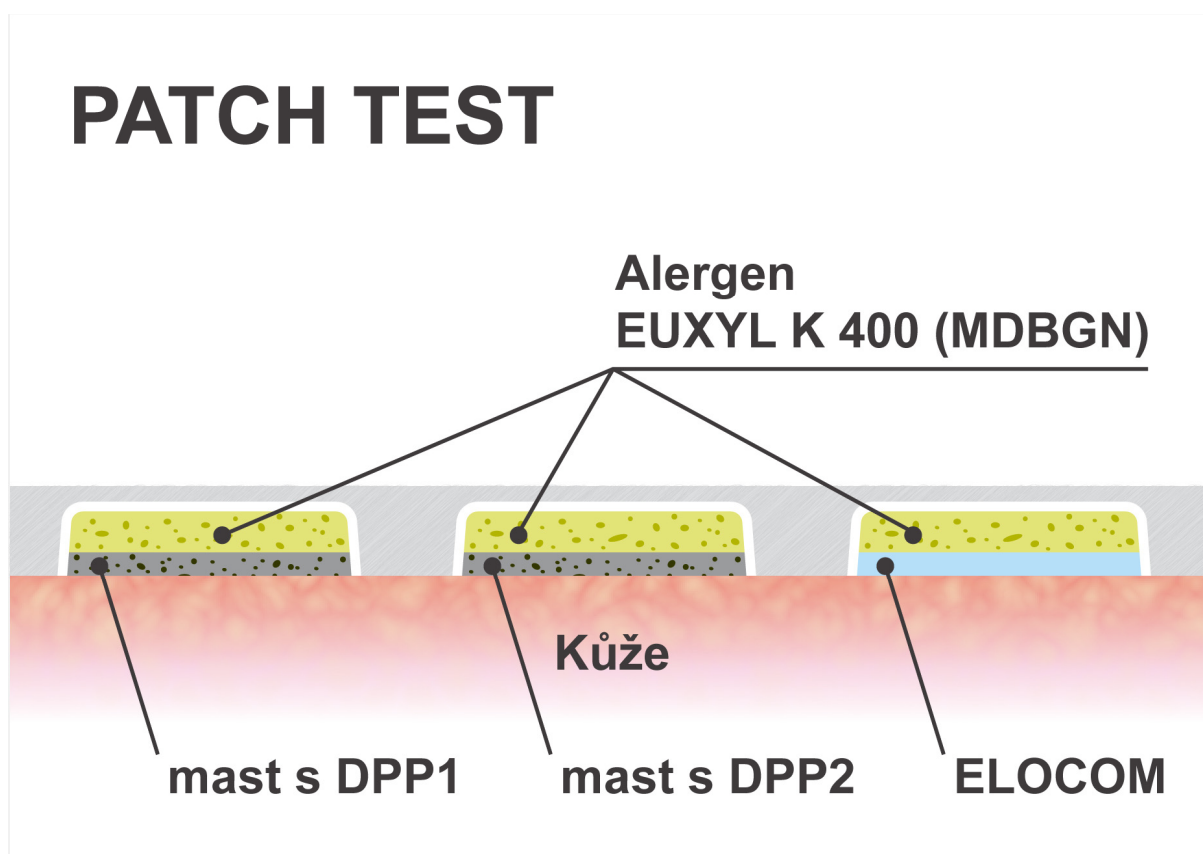


Obr. 48. Hypersenzitivita na Euxyl K 400 (Methyldibromoglutaronitrile - MDBFN), kůže pacienta 24 h po provedeném patch testu.



Na kůži tohoto velmi citlivého pacienta byl proveden patch test s připravenými mastmi s diamantovými prášky o koncentraci 0,005% a pro srovnání léku Elocom (Mometason; 0,1% mast).

Elocom patří do skupiny léků nazývajících se topické kortikosteroidy, používá se pro redukci symptomů alergického ekzému. Snižuje tedy zánět a podráždění kůže. Kortikosteroidy jsou ze skupiny protizánětlivých léků podobným hormonům vytvářeným v těle.

Pod tři okénka náplasti patch testu obsahujícími právě alergen Euxylu K 400, tedy MDGBN, byla nanášena mast s DPP 1, mast s DPP 2 a lék mast Elocom, schéma provedení patch testu je zobrazeno na **Obr. 49**. Masti byly v podstatě ve funkci bariery a měly snížit účinky alergenu na kůži našeho hypersenzitivního pacienta.



Obr.49. Pod tři okénka náplasti patch testu s alergenem Euxylu K 400, byla nanášena mast s DPP 1, mast s DPP 2 a mast Elocom. Masti tak měly snížit účinky alergenu na kůži hypersenzitivního pacienta.

| | |
|--|---|
| A |  |
| B |  |
| <p>Obr.50. (A) Patch test, <i>1</i> - mast s DPP1 (0,005%), <i>2</i> - mast s DPP2 (0,005%), <i>E</i> – mast Elocom, všechna okénka patch testu byla s alergenem MDGBN.</p> <p>(B) Pacientova kůže po patch testu.</p> | |

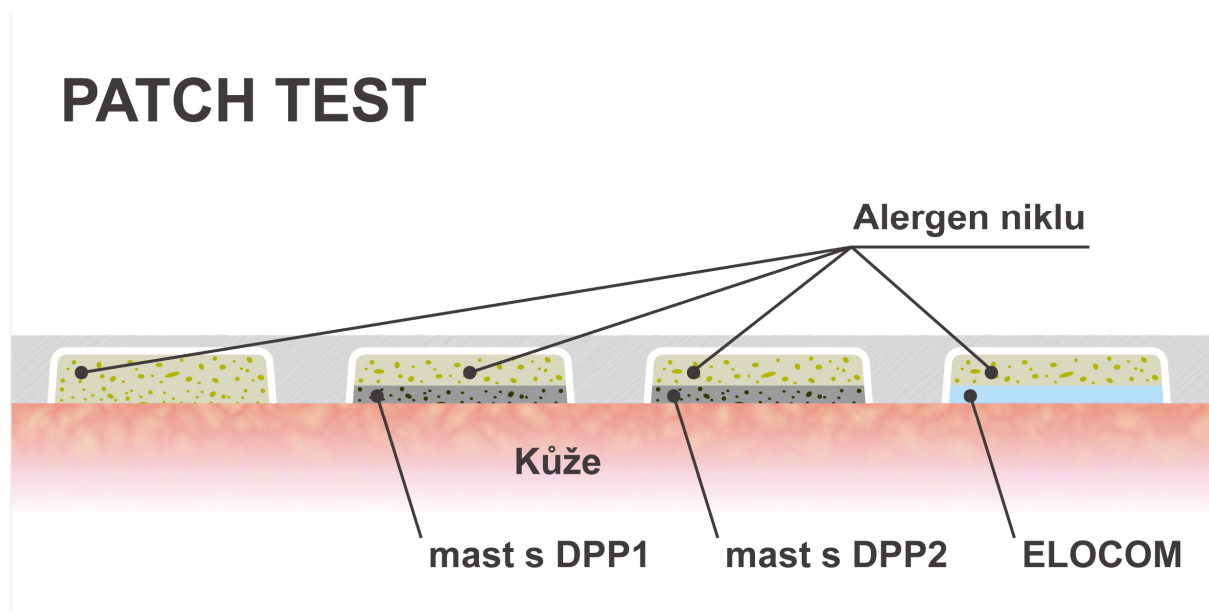
Mírné zarudnutí po patch testu viz. **Obr.50B** bylo způsobeno pomalejší reakcí masti s DPP na rozdíl od léku Elocom, který snížil zarudnutí (podráždění) téměř na minimum. Otázkou zůstává, jak by se projevilo případné zvýšení koncentrace diamantového prášku v masti.

Druhý pacient

Pacientka pracující v továrně, kde je v kontaktu s různými chemickými látkami. Je alergická na nikl, kobalt, olovo. Byla použita čtyři okénka patch testu s alergenem niklu, na kůži byla nanášena mast s DPP1 o koncentraci 1%, mast s DPP2 o koncentraci 1% a mast Elocom 0,1% viz schéma na **Obr.51**. Po odstranění patch testu byla označena oblast alergické reakce **Obr.52**. Reakce kůže na provedený patch test byla lékařem vyhodnocena takto:

| | |
|-------------|----------|
| Nikl | +++ |
| DPP 1 | +++ |
| DPP 2 | ++ / +++ |
| Elocom(st.) | ++ |

Zasažená oblast v důsledku působení alergenu niklu na kůži byla menší v případě použití masti s DPP2 o koncentraci 1% než bez použití masti a s mastí s DPP1 o koncentraci 1%. Reakce kůže v místě použití masti s DPP2 byla vyhodnocena mezi 2+ až 3+. I s použitím masti Elocom (0,1%) se alergická reakce kůže na nikl dostavila, byla vyhodnocena na 2+.



Obr.51. Pod okénka náplasti patch testu s alergenem niklu, byla nanášena mast s DPP 1, mast s DPP 2 a mast Elocom. Masti tak měly snížit účinky alergenu na kůži pacientky.



Obr.52. Kůže pacientky po patch testu, od shora: *Ni* - okénko s niklovými soli, *1* – na kůži byla nanесena mast s DPP 1 (1%) a přiloženo okénko s niklovými soli, *2* - mast s DPP 2 (1%) a okénko s niklovými soli, *St.*-mast Elocom a okénko s niklovými soli.

Třetí pacient

Byla žena podle svým informací trpící kontaktní alergií na Peruánský balzám (balzam of Peru), ale při testu s tímto alergenem se u ní hypersenzitivita neprojevila a kůže po patch testu nevykazovala alergickou reakci viz. **Obr.53**. Tudiž nemohly být vyhodnoceny a porovnány účinky mastí s DPP a léku Elocom na zmenšení alergické reakce. Ovšem na druhou stranu můžeme říci, že tento „nepodařený“ test prokázal, nealergičnost mastí s DPP1 s DPP2 a Elocomu pro tuto pacientku.



Obr.53. Kůže pacientky po patch testu, (bohužel pro nás) bez reakce na Peruánský balzám, označená pravá dolní strana zad.

6.4.2 Mast s DPP versus Mupirox









Cílem bylo porovnat antibakteriální a antiseptické vlastnosti masti s diamantovým práškem DPP 1 o koncentraci 0,5% s antibiotickým lékem Mupirox mast (mupirocinum, 20mg/g). Devíti dobrovolníkům byly provedeny mikrobiologické stěry vybraných míst (drobné změny na kůži, pupínky, škrábance od zvířat, nekrvavé ranky) viz. **Tab.14**. Místa byla potřena mastí s DPP 1 (0,5%) a mastí Mupirox. Vybraná místa byla subjektivně hodnocena a hodnocena po a při nanesení mastí a po dvou dnech od nanesení mastí viz. **Obr.54**.

Tab. 14. Výsledky mikrobiologického stěru devíti dobrovolníků

| Dobrovolník | Místo stěru | Výsledky mikrobiologického stěru |
|-------------|-------------|---|
| 1. | ruka | Staphylococcus epidermidis Staphylococcus aureus |
| 2. | zápěstí | negativní |
| 3. | ruka | negativní |
| 4. | palec | negativní |
| 5. | dekolt | negativní |
| 6. | rameno | Streptococcus pneumoniae |
| 7. | tvář | Staphylococcus epidermidis Staphylococcus aureus |
| 8. | tvář | Staphylococcus haemolyticus |
| 9. | tvář | Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis |

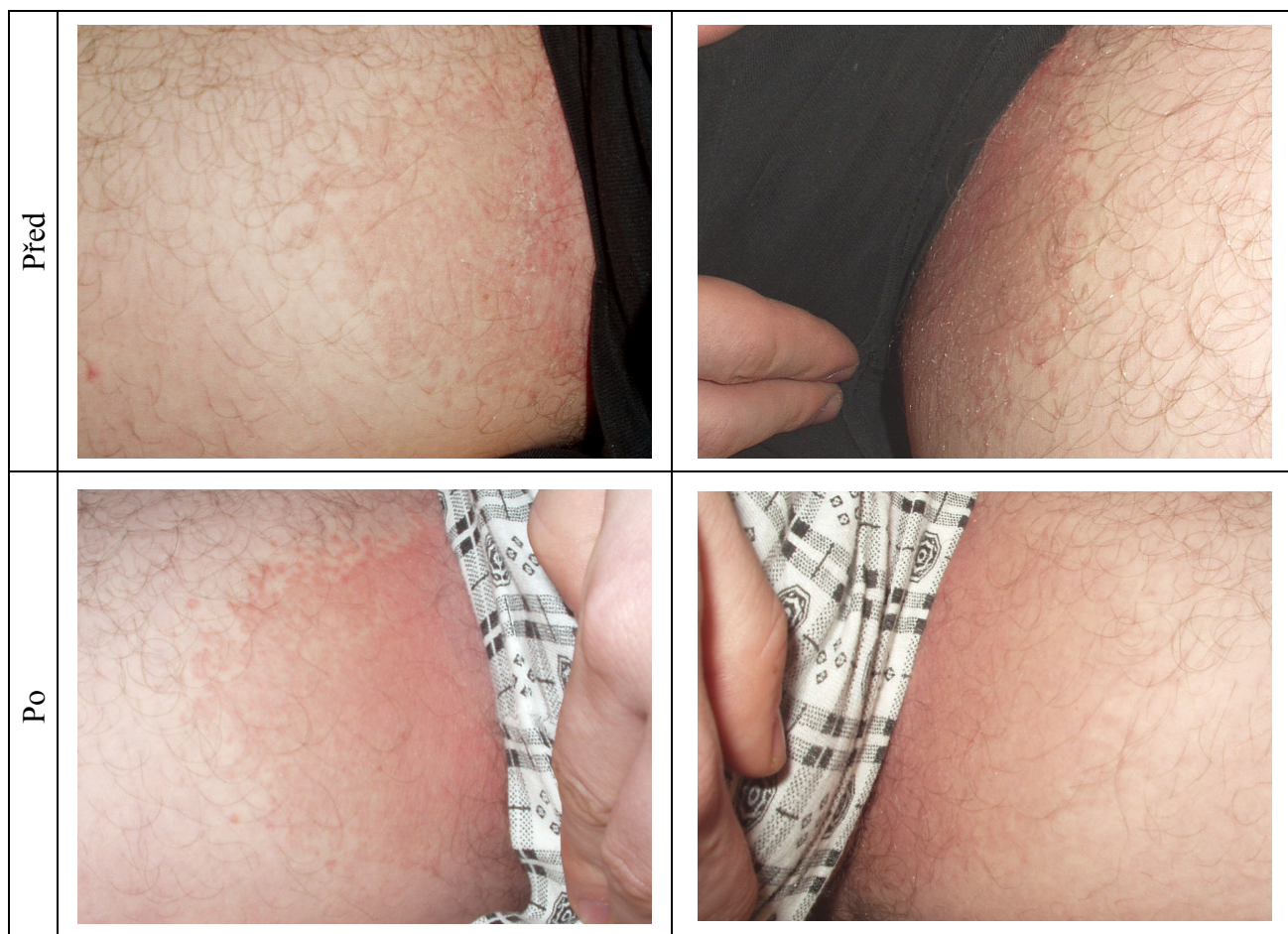
Většina dobrovolníků hodnotila působení obou mastí pozitivně, nikdo nepozoroval ani si nestěžoval na podráždění či jakékoli zhoršení stavu. Ovšem hlubší hodnocení antibakteriálních účinků masti s DPP 1 a porovnání s účinky masti Mupiroxu u rozličných defektů by nebylo u takto náhodně vybrané skupiny objektivní. Hodnocení by vyžadovalo dlouhodobé sledování skupiny více osob s podobným defektem kůže.

| | | |
|----|---|--|
| 1. |  |  |
| 2. |  |  |
| 3. |  |  |
| 4. |  |  |
| 5. |  |  |

| | | |
|---|---|--|
| 6. |  |  |
| 7. |  |  |
| 8. |  |  |
| 9. |  |  |
| <p>Obr. 54. Vlevo jsou fotografie vybraných míst u devíti dobrovolníků při nanesení mastí a vpravo fotografie toho samého místa po dvou dnech.</p> | | |

6.4.3 Mast s DPP versus Mykoseptin

Pro porovnání účinků masti s DPP1 o koncentraci 0,5% a lékem Mykoseptin mast byl vybrán dobrovolník trpící od dětství na odření a opruzení v oblasti třísel projevující se difúzním zarudnutím, pálením a případně svěděním. Používá Mykoseptin (Acidum undecylenicum 1,5g, Zinci undecylenas 6,0g ve 30g masti), který podle jeho slov dokáže zmírnit postižení kůže i když ne zcela. Složka Mykoseptinu kyselina undecylenová a její soli působí protiplísňově a do určité míry i protibakteriálně. Zda může projevy zmírnit i mast s DPP 1 jsme vyzkoušeli v desetidenním testu. Dobrovolník se natíral 1x denně postižené místo na jednom stehně mastí s DPP 1 a na druhém mastí Mykoseptin. Fotografie z testu před a po deseti dnech viz. **Obr.55.** ukazují vlevo oblast potíranou mastí Mykoseptin a vpravo mastí s DPP 1. Pokožka potíraná mastí s DPP 1 byla po testu v lepším stavu než strana potíraná Mykoseptinem. Bohužel ani mast s DPP 1 (0,5%) nedokázala odstranit příznaky, nicméně příznivě ovlivnila stav postižené kůže. V tomto případě by bylo pravděpodobně účinnější použít mast s práškem s DPP 2 (s jemnější zrnitostí) o koncentraci minimálně 1%, při nanášení masti ne 1x, ale 2x denně.



Obr.55. Fotografie postižené kůže před a po deseti dnech používání, vlevo potírané mastí Mykoseptin, vpravo mastí s DPP 1.

7. Diskuse výsledků

Stále je potřeba hledat možnosti úprav povrchu medicínských nástrojů a implantátů. Povlaky musí zajistit ochranu před negativními účinky kovových částí na lidský organizmus při vynikajících mechanických vlastnostech. Jak je zřejmé z výsledků měření kontaktního úhlu a výpočtu povrchové energie, uhlíkové vrstvy deponované metodou MW/RF PCVD umožňují díky variabilitě jejich depozičních parametrů případně upravit povrchovou energii dle požadavku na smáčivost konečné aplikace. Přes nevelký rozsah parametrů, je z výsledků pozorovatelná závislost povrchové energie a jejich složek na klesajícím průtoku metanu. Dále jsou nutná měření se statisticky dostatečně velkými soubory hodnot měřených kontaktních úhlů u vrstev z mnohem širšího rozsahu depozičních parametrů. To vše nejlépe na větších vzorcích s nízkou drsností povrchu, jako je tomu v našem případě.

U biologických aplikací právě povrchová energie vrstev významně ovlivňuje následnou přilnavost/nepřilnavost buněk (osteoblastů, erytrocytů atd.) k povrchu. To je zřetelné z provedených testů adheze a proliferace osteoblastů typu MG 63 na deponovaných uhlíkových vrstvách. Kdy v počtu adhezerovaných buněk na vrstvách v našem případě zvítězila vrstva 3, což je v porovnání s ostatními vrstvami vrstva s nižším kontaktním úhlem a vyšší povrchovou energií.

Pro aplikace, kde je adheze buněk nevýhodná či dokonce nežádoucí, jako jsou například fixátory na stabilizaci zlomenin (šrouby, dráty), které jsou po určité době vyndány, by byly naopak vhodné vrstvy typu vrstvy ze čtvrtého depozičního procesu s nižší povrchovou energií.

Mikrostruktura a topografie vrstev byla zobrazena třemi způsoby, jak optickým profilometrem, tak optickou mikroskopií a rastrovacím mikroskopem. Při sledování vrstev na optickém mikroskopu je možno vidět specificky orientované oblasti velikosti až sto mikrometrů. Tyto oblasti jsou na sebe různě orientované a vytvářejí tak různorodou strukturu povrchu. Textura je výrazná u vrstev dva a čtyři. První a třetí vrstva působí oproti ostatním hladším dojmem, s tolik nevystupující texturou, u těchto vrstev byla adheze buněk lepší. Zdá se, že popsaná textura vrstev může být v prvních dnech inicializace buněk naopak i překážkou v diferenciaci a adhezi buněk.

Kvalitní vrstvy pro takto náročné aplikace, však musí také dobrou adhezi k substrátu. Toto je zásadní problém oblasti povrchového inženýrství a velmi omezující charakteristika vrstev při jejich aplikacích. Ani náš případ bohužel není výjimka a kritické zatížení (20-30N)

při scratch testu vybízí k hlubšímu řešení přechodu vrstva - substrát, jakým mohou být například vhodné mezivrstvy.

Nanoindentační testy provedené metodou kontinuálního měření tuhosti s hrotem typu Berkovich neodhalily nijak vysoké tvrdosti. Vrstvy vykazují tvrdost kolem 15 GPa a substrát kolem 7 GPa. Měření mohlo být také ovlivněno malou tloušťkou vrstev, která byla cca 1 mikrometr a u první vrstvy tloušťka nedosahovala ani 0,5 mikrometru. Dalším měřením metodou DSI na přístroji Fischerscope s hrotem Vickers se tvrdost vrstev s menšími odlišnostmi potvrdila.

Velikost zrn dvou typů Diamond Powder Particles vytvořených v MW/RF PCVD reaktoru se dle analýzy SEM zhruba pohybuje od 0,6 μm u prvního (DPP 1) a od 0,2 μm u druhého prášku (DPP 2).

Diamond Powder Particles při testech in vivo prokázaly nejen vysokou biokompatibilitu, ale především bioaktivitu. Testy mastí obsahující diamantové prášky byly prováděny v porovnání s běžnými velmi účinnými léky jako je kortikosteroid Elocorn s vysokými protizánětlivými účinky. Zdá se, že při dostatečné koncentraci a malé zrnitosti prášků (tedy většímu „extended surface“) by se mohly diamantové prášky stát velmi slibným bioaktivním materiálem v mnoha aplikacích lékové medicíny, které vyžadují antibakteriální a protizánětlivé účinky.

8. Závěry

Úkolem předložené práce bylo seznámení se s požadavky kladenými na povrchové úpravy v oblasti modifikací povrchu implantátů a především rozšíření poznatků o uhlíkových vrstvách deponovaných metodou MW/RF PACVD na medicínskou ocel AISI 316L nebo vytvořenou ve formě prášku (DPP). Práce se zabývá nejen analýzou fyzikálních a mechanických vlastností vrstev, ale také jejich biologickými vlastnostmi v interakci s lidskými buňkami *in vitro* v případě vrstev a *in vivo* v případě prášků.

Výsledky práce lze shrnout do následujících bodů:

- Deponované uhlíkové vrstvy na daném substrátu vykazují tvrdost kolem 15 GPa a modul pružnosti cca 230 GPa. Maximální kritické zatížení při scratch testu bylo mezi 20-30N. Drsnost substrátu je 0,069 μm a drsnost vrstev se pohybuje mezi 0,068 – 0,085 μm . Kontaktní úhly pro destilovanou vodu jsou od 55° do 88°. Povrchová energie zkoumaných vrstev se podle grafické metody pohybuje od 36 do 45 mJ/m^2 . Výsledky ukazují na tendenci závislosti povrchové energie a jejich složek na průtoku metanu.
- Množství adherovaných osteoblastů sedmý den po jejich nasazení na povlakované vzorky, substrát a kontrolní materiály, byl v tomto pořadí : polystyren > sklo > vrstva 3 > vrstva 1 > vrstva 2 > vrstva 4 > AISI 316 L. Nejkratší doubling time mezi třetím a sedmým dnem kultivace buněk vykazovaly vrstvy 3 a 2, naopak nejdelší měl substrát následovaný vrstvou 1 a 4.
- Výsledky patch testů na hypersenzitivních pacientech prokázaly protizánětlivé účinky mastí s DPP. Diamond powder particles jsou při *in vivo* testech nejen biokompatibilní k lidskému organismu, ale chovají se jako bioaktivní částice. Při patch testech prokázaly protizánětlivé vlastnosti. Dle výsledků jsou tyto vlastnosti výraznější s menší zrnitostí prášků. Rychlost působení a jejich účinnost také závisí na koncentraci prášku v masti.
- Antibakteriální testy s mastí s DPP na dobrovolnících ukázaly další dobré možnosti využití a tedy i další směr testování DPP.

9. Publikace doktoranda

1. Šubrtová I., Mitura K.:

Biocompatibility Tests of Carbon Coatings Obtained by the Method MW/RF PCVD, Poster number 345 and presentation will be presented in Junior Euromat 2006, 4 - 8 September 2006 in Lausanne, Switzerland

2. Šubrtová I., Grausová L., Bačáková L., Kaczorowski W., Cerman J, Louda P.:

Biokompatibilita tenkých uhlíkových vrstev, Vědecká pojednání XII/2006, Academic coordination Center Journal, Vydavatel: Technická univerzita v Liberci; ISSN 1801-1128 v tisku červen 2006

3. Šubrtová I., Grausová L., Bačáková L., Kaczorowski W., Hájková P.:

Growth of cells on carbon coatings manufactured in new MW/RF reactor. In Abstract Book of International Conference 4-th Nanodiamond and Related materials jointly with 6-th Diamond and Related Films. Lodz : Technical University of Lodz, 2005. Poster 75, p.174, ISBN 83-917309-5-6

4. Šubrtová I. , Louda P. , Kaczorowski W.:

Properties of carbon coatings deposited in microwave - radio frequency plasma reactor. In Seminar Nanotechnology and vacuum. Bratislava : CEVATECH, 2005. ISBN 80-969435-0-2

5. Šubrtová I., Louda P.:

Uhlíkové vrstvy pro medicínské užití vytvořené v MW/RF PCVD reaktoru. In 2. mezinárodní odborný seminář Progresivní a netradiční technologie povrchových úprav. Praha : Česká společnost pro povrchové úpravy, 2005, s. 91- 93. ISBN 80-239-6135-7

6. Hollstein F., Červinka M., Louda P., Šubrtová I.:

Biocompatibility of thin layers. In Engineering of biomaterials, p.6-8, Numer 35-36 Rok VII ISSN 1429-7248, 2004

7. Hollstein F., Červinka M., Louda P., Šubrtová I.:

Biocompatibility of thin layers. In Summer School: Technology of Carbon Surfaces. Lodz / Sklarska Poreba / Liberec : TU of Lodz. 2003, p.19, No ISSN

8. Hollstein F., Weissbach A., Louda P., Šubrtová I.:

Untersuchungen an PVD-Dünnschichten für medizinische Instrumente. In Tagungsband zur 5. Industriefachtagung "Oberflächen- und Wärmebehandlungs-technik" und zum Werkstofftechnischen Kolloquium. Technische Universität Chemnitz - Lehrstuhl für Verbundwerkstoffe : Chemnitz 2003, pp.217-222, ISBN 3-00-011951-5, ISSN 1439-1597

9. Hollstein F., Červinka M., Louda P., Šubrtová I.:

Zvyšování užitečných vlastností povrchů plazmovými technologiemi. In Funkčné povrchy 2003 - zborník prednášok z mezinárodnej konferencie. Fakulta špeciálnej techniky Trenčanská univerzita Alexandra Dubčeka : Trenčín, 2003, p.49-54, ISBN 80-88914-89-2

10. Literatura

- [1] Brzeziński J.: Historia Medycyny. PZWL Poznań 1990.
- [2] Marciniak J.: Biomateriały. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [3] Chu P.K., Chen I.Y., Wang .L.P., Huang N.: Plasma surface modification of biomaterials. Mater. Sci. Eng R, 36, 2002,143-206.
- [4] Polska Norma PN-EN ISO 10993-1: Biologiczna ocena wyrobów medycznych.
- [5] Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E.: An Introduction to Materials in Medicine. Academic Press 1996.
- [6] Łaskawiec J., Michalik R.: Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [7] Aselme K.: Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 21, 2000, 667-681.
- [8] Enderle J., Blanchard S., Bronzino J.: Introduction to Biomedical Engineering. Academic Press 1999.
- [9] Jaruga Z., Nowakowska M.B: Chemia ogólna; Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1990.
- [10] Blumenthal N.C., Cosma V.; Inhibition of apatite formation by titanium and vanadium ions. J Biomed Mater Res 23 (A1suppl.),1989, 13-22.
- [11] Thull R.: Physicochemical principles of tissue material interactions. Biomol Eng 19, 2002, 43-50.
- [12] Ronold H.J., Ellingsen J.E.: Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting-tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. Biomaterials 23, 2002, 4211-4219.
- [13] Martini D., Fini M., Franchi M., Pasquale V.D., Bacchelli B., Gamberini M., Tinti A., Taddei P., Giavaresi G., Ottani V., Raspanti M., Guizzardi S., Ruggeri A.: Detachment of titanium and fluorohydroxyapatite particles in unloaded endosseous implants. Biomaterials 24, 2003, 1309-1316.
- [14] Gbureck U., Masten A., Probst J., Thull R.: Tribochemical structuring and coating of implant metal surface with titanium oxide and hydroxyapatite layers. Mater. Sci. Eng C 23, 2003, 461-465.
- [15] Hamada K., Kon M., Hanawa T., Yokoyama K., Miyamoto Y., Asaoka K.: Hydrothermal modification of titanium surface in calcium solutions. Biomaterials 23, 2002, 2265-2272.

- [16] Kim H.M., Miyaji F., Kokubo T., Nakamura T.: Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple Chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res* 32, 1996, 409-417.
- [17] Kokubo T., Kim H.M., Miyaji F., Takadama H., Miyazaki T.: Ceramic-metal and ceramic-polymer composites prepared by a biomimetic process. *Composites 30 Part A* 1999, 405-409.
- [18] Krasiczka-Cydzik E.: Badania impedancyjne tytanu i jego stopów implantowych. *Inż. Biomat.* IV, 2001, 27-31.
- [19] Viorneri C, Guenter H.L., Aronsson B.O., Pechy P. Descouts P.: Osteoblast culture on polished titanium disks modified with phosphonic acids. *J Biomed Mater Res* 62, 2002, 149-55.
- [20] Hwang K.E., Kim C.S.: Interface characteristics changed by heat treatment of Ti materials with hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng C* 23, 2003, 401-405.
- [21] Campbell A.A., Fryxel G.E., Linehan J.C., Graff G.L.: Surface-induced mineralization: A new method for producing calcium phosphatase coating. *J Biomed Mater Res* 32, 1996, 111-118.
- [22] Burakowski T., Major B.: Osadzanie laserem impulsowym PLD. *Inż. Mater.* XX, 1999, 339-343.
- [23] Hallgren C, Reimers H., Chakarov D., Gold J., Wennerberg A.: An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials* 24, 2003, 701-710.
- [24] Głuszek J.: Tlenkowe powłoki ochronne otrzymywane metodą sol-gel. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998.
- [25] Michalik R., Łaskawiec J., Klisch M.: Powłoki ochronne wytwarzane metodą sol-gel na implantach. *Inż. Mater.* XXIII, 2002, 372-375.
- [26] Kłyszejko-Stefanowicz L.: Elektroforeza w nośnikach, w: *Ćwiczenia z biochemii*; Kłyszejko-Stefanowicz L. (red.) Wydawnictwo PWN, Warszawa 1999.
- [27] Kula P.: *Inżynieria warstwy wierzchniej*. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź 2000.
- [28] Bakowicz K. Mitura S.: Biokompatibility of NCD. *J Wide Band-gap Mater.* 9, 2002, 261-272.
- [29] Mitura S., Niedzielski P., Jachowicz D., Louda P., Langer M., Marciniak J., Stanishevsky A., Tochitsky E., Couvrat P., Denis M., Lourdin P.: Influence of carbon origin on the properties important for biomedical application. *Diamond Relat. Mater.* 5, 1996, 1185-1188.

- [30] Chandra L, Clyne T.W., Allen M., Rushton N., Butter R., Lettington A.H.: The effect of biological fluids on the adhesion of diamond-like carbon films to metallic substrates. *Diamond Relat. Mater.* 4, 1995, 852-856.
- [31] Furman P., Głuszek J., Masalski J.: Struktura i własności elektrochemiczne warstwy TiO₂ otrzymanej metodą MOCVD. *Materiały III Ogólnopolskiej Konferencji, Obróbka powierzchniowa, Częstochowa-Kule 1996*, 229-233.
- [32] Łaskawiec J., Michalik R., Klisch M.: Właściwości użytkowe powłok hydroksyapatytowych na implantach z tytanu i jego stopów oraz ze stopów kobaltu. *Inżynieria Materiałowa XXIII*, 2002, 376-379.
- [33] Burakowski T., Roliński E., Wierzchoń T., *Inżynieria powierzchni metali*. Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1992.
- [34] Czarnowska E., Wierzchoń T., Maranda-Niedbata A.: Properties of the surface layers on titanium alloy and their biocompatibility in vitro tests. *J Mater Process Technol* 92-93, 1999, 190-194.
- [35] Aronson B.O., Lausmaa J., and Kasemo B.: Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials. *J Biomed Mater Res* 35, 1997, 49-73.
- [36] Maranda-Niedbata A., Wierzchoń T., Czarnowska E.: Structure and properties of the surface layers produced on Ti-Al-1Mn titanium alloy under glow discharge conditions. *Inż. Biomater.* V, 2001, 25-26.
- [37] Przybyłowicz K.: *Metaloznawstwo*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2003.
- [38] Krupa D., Baszkiewicz J., Mizera J., Wierzchoń T., Barcz A., Fillit R.: Effect of nitrogen-ion implantation on the corrosion resistance of OT-4-0 titanium alloy in 0.9%NaCl environment. *Surf Coat technol* 111, 1999, 86-91.
- [39] Puleo D.A.: Biochemical surface modification of Co-Cr-Mo. *Biomaterials* 17, 1996, 217-222.
- [40] Puleo D.A.: Activity of enzyme immobilized on silanized Co-Cr-Mo. *J Biomed Mater Res* 29, 1995, 951-957.
- [41] Puleo D.A.: Retention of enzymatic activity immobilized on silanized Co-Cr-Mo and Ti-6Al-4V. *J Biomed Mater Res* 37, 1997, 222-228.
- [42] Lu G., Bernasek S.J., Schwartz J.: Oxidation of polycrystalline titanium surface by oxygen and water. *Surface Science* 458. 2000, 80-90.

- [43] Ferris D.M., Moodie G.D., Dimond P.M., Gioranni C.W D , Ehrlich M.G., Valentini R.F.: RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials* 20, 1999, 2323-2331.
- [44] Pierschbacher M.D., Ruoslahti E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309, 1984, 30-33.
- [45] Geissler V., Wolf C, Schamweber D., Worck H., Wenzel P.: Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblast *J Biomed Mater Res* 51, 2000, 752-60.
- [46] Puleo D. A., Kissling R.A., Sheu M.S.: A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials* 23, 2002, 2079-2087
- [47] Schwartz J., Avaltroni M. J., Danahy M. P., Silverman BM, Hanson E.L., Schwarzbauer J. E., Midwood K.S., Gawalt E. S.: Cell attachment and spreading on metal implant materials. *Mater Sci. Eng. C* 23, 2003, 395-400.
- [48] Mora M., Cassinelli C.: Organic surface chemistry on titanium surface via thin film deposition. *J Biomed Mater Res* 37, 1997, 198-206.
- [49] Nanci A., Wuest J.D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S., McKee M.D.: Chemical modification of titanium surface for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 40, 1998, 324-335.
- [50] Satsangi A., Satsangi N., Glover R., Satsangi R. K., Ong J.L.: Osteoblast response to phospholipid modified titanium surface. *Biomaterials* 24, 2003, 4585-4589.
- [51] Morra M., Cassinelli C., Cascardo G., Cahalan P., Cahalan L., Fini M., Giardino R.: Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 24, 2003, 4639-4654.
- [52] Mikulec L.J., Puleo D.A.: Use of p-nitrophenyl chloroformate chemistry to immobilize protein on orthopedic biomaterials *J Biomed Mater Res* 32, 1996, 203-208.
- [53] Ushizawa K., Sato Y., Mitsumori T., Machinami T., Ueda T., Ando T.: Covalent immobilization of DNA on diamond and its verification by diffuse reflectance infrared spectroscopy. *Chem Phys Lett.* 351, 2002, 105-108.
- [54] Ida S., Tsubota T., Hirabayashi O., Nagata M., Matsumoto Y., Fujishima A., Tsubota T., Hirabayashi O., Ida S., Nagaoka S., Nagata M., Matsumoto Y.: Chemical reaction of hydrogenated diamond surface with peroxide radical initiator. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4, 2002, 806-811,
- [55] Pirek M., Okrój W., Przybyszewska I., Jakubowski W., Walkowiak B., Chemiczna modyfikacja proszków diamentowych. *Inż. Biomat.* VII, 2004, 36-39.

- [56] Castaneda S.I., Espinoza V.A.A., Fiere F.L., Franceschini D. F., Jacobsohn L.G.: Surface modifications in diamond-like carbon films submitted to low-energy nitrogen ion bombardment, Nucl Instr and Meth B 175-177,2001,699-70.
- [57] Przybyszewska-Doroś I., Okrój W., Walkowiak B.: Surface modifications of metallic implants. In Engineering of biomaterials, VIII, 2005, ISSN 1429-7248, p.52-62
- [58] Uhlík [online, cit. 2006-06-19]. Dostupné z:<<http://cs.wikipedia.org/>>
- [59] Guseva M.B., Babaev V.G., Kudryavtsev Yu.P., Alexandrov A.F., Khvostov V.V., Diamond Realt. Mater. 4 (1995)1142
- [60] Szurgot M.,Karczewska A., Mitura S., Diamond in meteorites, International Conference 4-th Nanodiamond and Related Materials jointly with 6-th Diamond and Related Films, Abstract book, 2005
- [61] Kratochvíl B., Švorčík V., Vojtěch D.: Úvod do studia materiálů. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2005. Str. 116. ISBN 80-7080-568-4
- [62] Benáková Z., Fullereny [online, cit. 2006-06-19]. Dostupné z: <<http://math.fce.vutbr.cz/>>
- [63] Service R.F.: Carbon nanofoam, Science 304 (2004) 42
- [64] Schewe P., Stein B., Carbon Nanofoam is the Frist Pure-Carbon Magnet, Physics News Update, Number 678 #1, March 26, 2004
- [65] Liu H., Dandy D.S.: Diamond Chamilal Vapour Deposition, Nucleation and Early Growth Stages, Noyes Publications, 1995, ISBN: 0-8155-1380-1
- [66] Robertson J.: Diamond-like amorphous carbon, Materials Science and Engineering R37 (2002) 129-281
- [67] d'Agostino, R. et al. (ed.) Plasma processing of Polymers. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1997
- [68] Cvrček L., Disertační práce: Plazmová polymerizace difúzně bariérových vrstev a její aplikace, Západočeská univerzita v Plzni, 2002
- [69] Lin Y.,Yasuda H.: Effect of plasma polymer deposition methods on copper corrosion protection. Journal of Applied Polymer Science.1996, vol. 60, s. 543-555.
- [70] Lieberman M.A., Lichtenberg A.J.: Principles of plasma discharges and materials processing. New York: John Wiley & Sons Inc., 1994.
- [71] Musil J.: Basic properties of low-pressure plasma. International School of Physics „Enrico Fermi“ Course CXXXV.1997, Amsterdam: IOS Press, Nizozemsko.

- [72] Jacob W., Moller W., Appl. Phys. Lett. 63 (1993) 1771
- [73] McKenzie D.R., Rep.Prog. Phys. 59 (1996) 1611.
- [74] Koidl P., Wagner C., Dischler B., Wagner J., Ramsteiner M., Mater. Sci. Forum 52 (1990)41.
- [75] Weiler M., Sattel S., Jung K., Ehrhardt H., Veerasamy V.S., Robertson J., Appl. Phys. Lett. 64 (1994) 2797
- [76] Szyller-Tracz M., Żakowska I., Jóźwik K.: Measurements of fluidity and mikroviscosity of morphotic elements of patients with an artificial heart valve. In Summer School: Technology of Carbon Surfaces. Lodz / Sklarska Poreba / Liberec : TU of Lodz. 2003, No ISSN
- [77] Witkowski D., Jóźwik K., Obidowski D.: Numerical investigation of a flow through an artificial heart valve with and NCD coating. In Summer School: Technology of Carbon Surfaces. Lodz / Sklarska Poreba / Liberec : TU of Lodz. 2003, No ISSN
- [78] Catledge S.A., Fries M., Vohra Y.K.: Nanostructured surface modifications for biomedical implants. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Volume X, p.(1-22), 2003, ISBN: 1-58883-001-2
- [79] Guzdek T., Szmidt J., Dudek M., Niedzielski P.: Chemosensor with NCD dielectric layer as open gate in chemFET. In Summer School: Technology of Carbon Surfaces. Lodz / Sklarska Poreba / Liberec : TU of Lodz. 2003, No ISSN
- [80] M.P.Siegal, D.R.Tallant, P.N. Provecio, D.L. Overmyer, R.L. Simpson, L.J.Martinez-Miranda, Appl.Phys.Lett.76, 3052 (2000)
- [81] Mitura K., Niedzielski P., Bartosz G., Moll J., Walkowiak B., Pawlowka Z., Louda P., Kieć-Świerczyńska M., Mitura S.: Interactions between carbon coatings and tissue, Surface & Coating Technology, 2005
- [82] Mitura K., Bartosz G., Mitura S.: The inhibition of haemolysis in presence diamond powder particles in conditions of free radical damage, Engineering of biomaterials, Numer 43-44, Rok VII, 2004, ISSN 1429-7248
- [83] Bartosz M., Kedziora J., Bartosz G.: „Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril“, Free Radical Biology and Medicine, Vol.23, No.5, (1997), 729-735
- [84] K. Jamada: „Shock synthesis of a new cubic form of carbon“, Carbon, Vol. 41, No. 6, (2003), 1309-1313

- [85] J. Ristein, M. Riedel, F. Maier, B.F. Mantel, M. Stammler, L. Ley: „Surface doping: a special feature of diamond“, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 13, (2001), 8979-8987.
- [86] S. Mitura, K. Bakowicz: „Bioactivity of diamond“, 13th Conference on Diamond, Diamond – Like Materials, Carbon Nanotubes, Nitrides and Silicon Carbide, Abstract Book, September 2002, Granada, Spain.
- [87] I.V. Shugalej, N.P. Dubjago, V.Yu. Dolmatov, M.A. Ilyushin, S.N. Lvov, I.V. Tselinskii, M.M. Shamtsian, S.D. Shilov: Nanodiamonds of detonation synthesis for correction of the states accompanied by oxidative stress, In Abstract book, Int. Conf. 4-th Nanodiamond and Related Materials jointly with 6-th Diamond and Related Films, Poland, 2005
- [88] Deepak Prasad Subedi: Surface modification of polymers by low temperature plasmas, disertační práce, Masarykova univerzita Brno, 2002
- [89] D. K. Owens, R. C. Wendt: *Journal of Appl. Polym. Sci.*, 13 (1969) 1741-1747
- [90] J. Kloubek, Developments of Methods for Surface Free Energy Determination Using Contact Angles of Liquids on Solids, *Advances in Colloid and Interface Science*, (1992) 99-142
- [91] F. M. Fowkes, *Ind. Eng. Chem.*, 56 (1964) 40
- [92] F. M. Fowkes, In Contact Angle Wettability and Adhesion, *Advance Chemical Ser. No. 43*. American Chemical Society, Washington DC, (1964)
- [93] F. M. Fowkes, M. A. Mostafa, *Int. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 17 (1978) 3
- [94] F. M. Fowkes, D. C. McCarthy, M. A. Mostafa, *J. Colloid Interface Sci.*, 78 (1980) 200
- [95] E. H. Andrews, N. E. King, *Surface Energetics and Adhesion // Polymer Surfaces*, (D. T. Clark, W. J. Feast, editors.) , John Wiley & Sons, (1978)
- [96] D. H. Kaelble, K. C. Uy, *Journal Adhesion*, 2 (1970) 50
- [97] S. Wu, *Journal Adhesion*, 5 (1973) 39
- [98] H. W. Fox, E. F. Hare, W. A. Zisman, *Wetting Properties of Organic Liquids on High Energy Surfaces*, *Journal Adhesion*, 59 (1955) 1097-1106
- [99] W. D. Harkins, E. H. Loesner, *Journal Chem. Phys.* 18 (1950) 556

- [100] N. T. Correia, J. J. Ramos, J. V. Saramago, J. C. G. Salado, *Journal of Colloid and Interface Science*, 189 (1997) 631-639
- [101] B. Janczuk, T Bialopiotrowicz, W. Wojcik, The Components of Surface Tension of Liquids and Their Usefulness in Determination of Surface Free Energy of Solids, *J. of Colloid and Interfaces Science*, 127(1) (1989) 59-66
- [102] Norma DIN 53 364
- [103] J. Hladík, Návrh metodiky řešení adheze polymerního povlaku ke kovovým substrátům, diplomová práce TU v Liberci, 2003
- [104] A. Bateni et al., A High-accuracy Polynomial Fitting Approach to Determine Contact Angles, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 219 (2003) 215-231
- [105] M. W. Yang, S. Y. Lin, A Method for Correcting the Contact Angle from $\theta/2$ Method, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 00 (2003) 1-12
- [106] S. Bordi, M. Carla, R. Cecchini, Surface Tension Measurements: Toward Higher Accuracy, *Electrochimica Acta*, 34 (1989) 1673-1676
- [107] F. K. Skinner, Y. Rotenberg, A. W. Neumann, *J. Colloid Interfer. Sci.* 130 (1989) 25
- [108] A. W. Adamson, *Physocal Chemistry of Surfaces*, fifth ed (chapter 10), Wiley New York, (1999) 389
- [109] R. Y. Tsay, S. C. Yan, S. Y. Lin, *Rev. Sci. Instrum.*, 66 (1995) 5065
- [110] Kyowa Interface Sci. Co., FACE Contact Angle Meter, model CA-Z, Tokyo, Japan
- [111] A. W. Neumann, et al, An Equation of State Approach to Determine Surface Tension of Low Energy Solids from Contact Angles, *J. of Colloid and Interface Science*, 49(2) (1974) 291-304
- [112] Y. Rotenberg, I. Boruvka, A. W. Neumann, *J. Colloid Interf. Sci.*, 93 (1983) 169
- [113] C. Huh, R. L. Reed, *J. Colloid Interf. Sci.* 91 (1983) 472
- [114] A. S. Dimitrov, et al, *Journal Colloid Sci.*, 142 (1991) 279
- [115] S. Y. Lin, H. C. Chang, L. W. Lin, P. Y. Huang, *Rev. Sci. Instrum.*, 67 (1996) 2852
- [116] Kolouch, A.: Disertační práce, Aplikace plazmových výbojů pro úpravy a zušlechťování povrchů, Technická univerzita v Liberci, KMT, 2004

- [117] Helísková Z., Veverková G., Vyroubalová H.: pod vedením Doc.MUDr. Jana Šimůnka, CSc. v rámci studentského projektu „Budoucí učitelé a alergie“ zpracováno pod číslem G 136 na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity v Brně, 1997,
- [118] K.Bakowicz, Bioaktywnosc diamentu, Ph.D.Thesis, Politechnika Lodzka, 2003
- [119] RNDr.Vacková Ludmila, Astma a alergie, EWA Edition Praha, 1997
- [120] Vocilková A. Kontaktní dermatitida. Remedica 2001;11:252–259.
- [121] Prewiew of Understanding Eczema, Dostupné z:<<http://www.familydoctor.co.uk/>>
- [122] Benjamin Cummings,an imprint of Addison Wesley Longman, Inc., 2001
- [123] M.J.Jonker and D.P.Bruynzeel: The outcome of an additional test reading on days 6 or 7. Contact dermatitis, 42, 2000, str. 330-335.
- [124] Materiály firmy Chemotechnique diagnostics AB, Dostupné z: <<http://www.chemotechnique.se>> a také z <<http://bioderma-cz.com>>
- [125] Kaczorowski W., Niedzielski P., Mitura S.: Manufacture of carbon coating for biomedical applications in a new MW/RF reactor. Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 28-31 ISSN1429-7248
- [126] Kaczorowski W., Praca doktorska, Warstwy weglowe wytwarzane w plazmie dwuczesotliwosciowe, Politechnica Łódzka, Instytut Inzinerii Materialowej, Zaklad Inzynierii Biomedycznej, 2005
- [127] Grégr J., Dílčí projekt: Textilie pro speciální aplikace, Centrum textil Technická Univerzita v Liberci
- [128] Product description, FRT MicroProf , FRT FRIES RESEARCH & TECHNOLOGY GmbH, Kapitel 2,
- [129] Instruction Manual for Nano Indenter XP. MTS System Corporation, 2002.
- [130] ISO/DIS 14577-1.2 - Metallic materials - Instrumented indentation test for hardness and materials parameters. International Organization for Standardization, 2001
- [131] Bačáková L., Jungová I., Slosarczyk A., Zima A., Paszkiewicz Z.: Adhesion and growth on human osteoblast like MG 63 cells in cultures on calcium phosphate-based biomaterials. Engineering of Biomaterials, 38-43,(2004), 15-18
- [132] Bačáková L., Lapčíková M., Kubies D., Rypáček F.: Adhesion and growth of rat aortic smooth muscle cells on lactide-based polymers. Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies. Edited by Y. Murat Elçin, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Volume 534, 2003, 179-189

- [133] Ramlogana D., Basketterb D.A., Becka M.H.: Methyldibromoglutaronitrile: An Increasingly Important Allergen in the UK; *Exogenous Dermatology* 2003;2:184-189 (DOI: 10.1159/000076799)
- [134] Bruze M., Goossens A., Gruvberger B.: Recommendation to include methyldibromo glutaronitrile in the European standard patch test series; *Contact Dermatitis* 2005;52:24-28